



**Ana Paula Dias
Amorim**

**Extração e purificação de imunoglobulina G
utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos
por líquidos iónicos como adjuvantes**

**Extraction and purification of immunoglobulin G
using aqueous biphasic systems constituted by ionic
liquids as adjuvants**



**Ana Paula Dias
Amorim**

**Extração e purificação de imunoglobulina G
utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos
por líquidos iónicos como adjuvantes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro no âmbito do Mestrado em Bioquímica, Ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora no Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro, e da Doutora Ana Margarida Nunes da Mata Pires de Azevedo, Investigadora Auxiliar do Departamento de Bioengenharia, Instituto de Bioengenharia e Biociências, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa

«O querer e o trabalho transformam o sonho em realidade.»
- Colégio Didálvi

o júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

professor auxiliar com agregação do Departamento de Química, QOPNA, da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Fani Pereira de Sousa

professora auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior

Doutora Mara Guadalupe Freire Martins

investigadora coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Não há palavras suficientes para agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram na realização desta dissertação.

palavras-chave

Biofármacos, Anticorpos monoclonais, Imunoglobulina G, Purificação, Sistemas Aquosos Bifásicos, Líquidos Iônicos.

resumo

Os anticorpos monoclonais (mAbs) apresentam-se como uma das classes prevalentes de proteínas recombinantes terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, incluindo o cancro (ex: cancro da mama, leucemia e cancro da próstata), e doenças autoimunes (artrite reumatoide e doença de Crohn), cardiovasculares e infecciosas. Atualmente, a produção de IgG apresenta uma limitação maioritária que compreende a sua etapa de captura através de cromatografia de afinidade com proteína A (proA), seguida de duas etapas cromatográficas de purificação. Apesar da sua vasta utilização na indústria farmacêutica, a utilização de cromatografia nas várias etapas traduz-se num elevado custo do produto final.

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) apresentam-se como uma alternativa não-cromatográfica para a purificação de mAbs, permitindo uma redução de custos e do número de etapas envolvidas no processo de purificação. No entanto, os SAB tradicionais constituídos maioritariamente por sais e/ou polímeros têm-se mostrado pouco seletivos, resultando em baixos rendimentos e fatores de purificação. A utilização de líquidos iônicos (LIs) neste tipo de sistemas pode ser vantajosa em termos de seletividade uma vez que é possível manipular a polaridade e afinidade das fases coexistentes do SAB através da escolha adequada da sua estrutura química. Neste sentido, o objetivo deste trabalho consiste no estudo de diferentes LIs como adjuvantes em SAB convencionais do tipo polímero-polímero, nomeadamente PEG/dextrano, para a purificação de IgG diretamente de sobrenadantes de linhas celulares desenvolvidas a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO). Para tal, determinaram-se primeiramente os diagramas de fases dos sistemas quaternários constituídos por PEG + Dextrano + H₂O + LIs, e posteriormente avaliou-se o seu potencial para extrair seletivamente ou purificar mAbs a partir dos sobrenadantes estudados. Através dos dados obtidos, é possível constatar que a presença de LIs como adjuvantes permite manipular a polaridade e afinidade das fases do SAB, permitindo aumentar o seu potencial de extração de IgG. Mais ainda, os sistemas constituídos por 15% de [C₄mim]Br e 5% de [C₄mim][HSO₄] demonstraram-se promissores para a extração de IgG, potenciando a extração do anticorpo para a fase rica em PEG com um rendimento superior a 90%, embora com um baixo grau de pureza. Face aos resultados obtidos, é ainda necessário otimizar os SAB estudados, o que pode ser alcançado variando a composição do sistema e natureza do LI adicionado, de modo a desenvolver uma plataforma de captura de mAbs diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO capaz de competir com a cromatografia proA atualmente utilizada.

keywords

Biopharmaceuticals, Monoclonal Antibodies, Immunoglobulin G, Purification, Aqueous Biphasic Systems, Ionic Liquids

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are a prevalent class of recombinant therapeutic proteins with potential to be used in the treatment of a variety of diseases, including cancer (e.g. breast cancer, leukaemia and prostate cancer), and autoimmune (rheumatoid arthritis and Crohn's disease), cardiovascular and infectious diseases. Currently, the IgG production has a major limitation corresponding to its capture step through protein A (proA) affinity chromatography, followed by two additional chromatographic steps. Despite its wide use in the pharmaceutical industry, the use of chromatography and various separation steps result into a high cost of the final product.

Aqueous biphasic systems (ABS) are non-chromatographic alternatives for the purification of mAbs, allowing a reduction of costs and number of steps involved in the purification process. However, traditional ABS composed predominantly of salts and/or polymers have shown to be poorly selective, resulting in low yields and purification factors. The introduction of ionic liquids (ILs) into such systems can bring advantages in terms of the process selectivity since it is possible to manipulate the polarity and affinity of the coexisting phases of ABS through the proper choice of their chemical structure. In this context, the objective of this work comprises the study of different ILs as adjuvants in conventional ABS, namely constituted by PEG and dextran, for the purification of IgG directly from supernatants of cell lines from Chinese hamster ovary (CHO). To this end, the phase diagrams of the PEG + Dextran + H₂O + ILs quaternary systems were firstly determined and characterized, and their potential in the extraction and purification of mAbs further evaluated. Through the obtained data, it is possible to verify that the presence of ILs as adjuvants allows to manipulate the polarity and affinity of the phases of the ABS, allowing to increase their potential for the extraction of IgG. Moreover, the systems composed of 15% of [C₄mim]Br and 5% of [C₄mim][HSO₄] are promising for the extraction of IgG, although with a low level of purity. Based on the gathered results, it is still required to optimize the studied ABS, which can be achieved by changing the systems composition or nature of the added IL, in order to develop an efficient platform to capture mAbs directly from CHO cell culture supernatants as a competitive alternative to the currently used proA chromatography.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Anticorpos	1
1.2. Terapêutica utilizando anticorpos.....	5
1.3. Métodos de purificação de anticorpos monoclonais	6
1.3.1. Métodos convencionais	6
1.3.2. Métodos alternativos.....	9
1.4. Sistemas aquosos bifásicos (SAB)	12
1.4.1. Líquidos iônicos e aplicações nos SAB	18
2. Materiais e métodos	21
2.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8	21
2.1.1. Linha celular e meio de cultura	21
2.1.2. Passagem celular	21
2.2. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H₂O + LI.....	22
2.2.1. Reagentes químicos	22
2.2.2. Reagentes biológicos	24
2.2.3. Procedimento experimental para a caracterização do sistema	24
2.2.3.1. Determinação dos diagramas de fase.....	24
2.2.4. Procedimento experimental para a extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO	26
2.2.4.1. Preparação dos SAB	26
2.2.4.2. Determinação do pH das fases.....	27
2.2.4.3. Quantificação de IgG.....	27
2.2.4.4. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG	28
2.2.4.6. Determinação do grau de pureza da IgG.....	28
2.2.5. Avaliação do perfil proteico	29
3. Resultados e Discussão.....	31
3.1. Caracterização dos SAB constituídos por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LIs31	
3.2. Extração e purificação de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO 40	
4. Conclusões e trabalho futuro	48
5. Referências.....	49
6. Anexos.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Métodos cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.	9
Tabela 2 - Métodos não cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.	11
Tabela 3 - SAB investigados por Aires-Barros e colaboradores (24,54,55,73–86) para a extração e purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.	17
Tabela 4 - Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação 2.	32
Tabela 5 - Dados experimentais das TLs e TLLs para o sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O.	32
Tabela 6 - Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação 2.	37
Tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI, em que: FS – fase superior; FI – fase inferior; M – ponto de mistura.	38
Tabela 8 - Condições testadas para a extração seletiva e purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 com o sistema ternário controle PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI.	41

Índice de Figuras

Figura 1 - (A) Representação esquemática de um anticorpo convencional. Este é composto por duas cadeias leves (representadas a vermelho) e duas cadeias pesadas (representadas a azul), formando desta forma uma proteína com uma forma em “Y”. As cadeias pesadas apresentam três secções contantes (azul claro) e uma região variável (azul escuro). As cadeias leves apresentam uma região constante (rosa claro) e uma região variável (rosa escuro). A parte inferior do anticorpo é designada região Fc, à qual se encontram associados dois braços, as regiões Fab. As cadeias leves e pesadas associam-se por ligações de dissulfureto. Os domínios variáveis apresentam regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que ligam diretamente ao antigénio. (B) Representação tridimensional de um anticorpo convencional. As cadeias pesadas encontram-se representadas a verde e a azul, enquanto que as cadeias leves da molécula se encontram representadas a laranja e rosa. Adaptado de Moran et al. (2).	1
Figura 2 - Estruturas gerais das cinco classes principais de anticorpos. As cadeias leves são representadas pelas tonalidades mais claras, enquanto que as cadeias pesadas são apresentadas pelas tonalidades mais escuras, e as ligações dissulfureto representam-se pelas linhas pretas espessas. A (a) IgG, (b) IgD e (c) IgE são sempre representadas da forma presente na figura. Já as formas poliméricas de IgM e IgA contêm um polipéptido, denominado cadeia J (linha azul), que está ligado por duas ligações dissulfureto à região Fc em dois monómeros diferentes. Assim, a IgM (e) sérica é sempre um pentâmero; enquanto, que a maior parte das IgA (d) séricas existam sob a forma de um monómero, embora dímeros, trímeros e mesmo tetrâmeros estejam por vezes presentes. Adaptado de Owen et al. (6).	3
Figura 3 – Plataforma típica de processamento de mAbs. Os sobrenadantes das culturas celulares resultantes do processo são habitualmente purificados através de um processo de captura por cromatografia proA. De modo a remover todos os contaminantes após esta etapa de captura, e de forma a obter uma pureza final em conformidade com as agências reguladoras, são aplicadas duas etapas adicionais de purificação. Adaptado de Rosa et al. [2].	7
Figura 4 - Representação esquemática de um diagrama de fases hipotético constituído por dois polímeros (polímero 1 polímero 2). A curva binodal está representada pelos pontos A-B-C-D, e separa a região monofásica da região bifásica. Os pontos B-M-D representam uma tie-line, que para um qualquer ponto de mistura ao longo desta, a composição exata das fases superior e inferior do SAB serão sempre D e B, respetivamente. A razão volumétrica das duas fases coexistentes encontra-se representado graficamente junto de cada ponto da tie-line. Adaptado de Freire et al. (60).	14
Figura 5 - Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes nos sistemas PEG+Dextrano+H ₂ O: (i) [N ₁₁₁₁]Cl; (ii) [N ₄₄₄₄]Cl; (iii) [P ₄₄₄₄]Cl; (iv) [P ₄₄₄₍₁₄₎]Cl; (v) [C ₄ mpy]Cl; (vi) [Ch]Cl; (vii) [Ch][Ac]; (viii) [Ch][But]; (ix) [Ch][DHP]; (x) [Ch][Bit]; (xi) [Ch][NTf ₂]; (xii) [C ₄ mim]Cl; (xiii) [C ₄ mim]Br; (xiv) [C ₄ mim][HSO ₄].	23
Figura 6 - Diagrama de fases do sistema ternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (♦); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (—).	32
Figura 7 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - ■, 5% de LI - ♦, 10%	

de LI - ●, e controlo ▲); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - —, 5% de LI - —, 10% de LI - —, e controlo —); em que A - [N ₁₁₁₁]Cl e B - [N ₄₄₄₄]Cl.	33
Figura 8 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - ■, 5% de LI - ◆, 10% de LI - ●, e controlo ▲); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - —, 5% de LI - —, 10% de LI - —, e controlo —); onde A - [P ₄₄₄₄]Cl e B - [P ₄₄₄₍₁₄₎]Cl.	34
Figura 9 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - ■, 5% de LI - ◆, 10% de LI - ●, e controlo ▲); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - —, 5% de LI - —, 10% de LI - —, e controlo —); em que A - [C ₄ mim][HSO ₄], B - [C ₄ mim]Br, C - [C ₄ mim]Cl e D - [C ₄ mpy]Cl.	35
Figura 10 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - ■, 5% de LI - ◆, 7,5% de LI - ×, 10% de LI - ●, 15% de LI - ×, e controlo ▲); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - —, 5% de LI - —, 7,5% de LI - —, 10% de LI - —, 15% de LI - —, e controlo —); onde A - [Ch][NTf ₂], B - [Ch][Bit], C - [Ch][DHP], D - [Ch]Cl, E - [Ch][Ac] e F - [Ch][But].	36
Figura 11 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	42
Figura 12 - Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	42
Figura 13 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	43
Figura 14 - Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	44
Figura 15 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	45
Figura 16 - Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.	45
Figura 17 - SDS-PAGE de um gel, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 - marcador de peso molecular; Poço 2 - IgG pura Gammanorm; Poço 3 - sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços - fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [C ₄ mpy]Cl). A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas no próprio gel.	47

Lista de abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido diglutárico
BSA	Albumina de soro bovino
C	Regiões constantes
CDC	Citotoxicidade dependente do complemento
CDRs	Regiões determinantes de complementaridade
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CIH	Cromatografia de interação hidrofóbica
CTA	Cromatografia de troca aniônica
CTC	Cromatografia de troca catiônica
EE _{IgG} %	Eficiência de extração de IgG
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável dos anticorpos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	Fator de purificação
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HIB	Células de hibridoma
HPS	Hidroxipropil amido
HRP	Peroxido de rábano
Ig	Imunoglobulina
LI	Líquido iônico
MA	Mistura artificial
mAbs	Anticorpos monoclonais
NK	Células exterminadoras naturais
pAbs	Anticorpos policlonais
PEG	Polietileno glicol
PPG	Polipropilenoglicol
ProA	Proteína A
PVDF	Polivinilidino
SAB	Sistema aquoso bifásico
TEG-AG	Trietileno glicol-ácido diglutárico
TL	<i>Tie-line</i>
TLL	Comprimento da tie-line
UCON	Óxido de etileno/óxido de propileno
UF/DF	Ultrafiltração/diafiltração
V	Regiões variáveis
Y _{IgG} %	Rendimento de recuperação de IgG
[Ch][Ac]	Acetato de colina
[Ch][Asc]	L-ascorbato de colina
[Ch]Cl	Cloreto de colina
[Ch][Bit]	Bitartarato de colina
[Ch][But]	Butanoato de colina
[Ch][DHP]	Dihidrogenofosfato de colina
[Ch][D-Gal]	D-galactouronato de colina
[Ch][Gly]	Glicolato de colina
[Ch][Lac]	Lactato de colina

[Ch][NTf ₂]	Bis(trifluorometilsulfonilamida) de colina
[Ch][Pyr]	Piruvato de colina
[Ch][Qui]	D-(-)-quinato de colina
[C ₄ mim]Br	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ mim]Cl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ mim][HSO ₄]	Hidrogenossulfato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ mpy]Cl	Cloreto de 1-butil-4-metilpiridínio
[N ₁₁₁₁]Cl	Cloreto de tetrametilamónio
[N ₄₄₄₄]Cl	Cloreto de tetrabutílamónio
[P ₄₄₄₄]Cl	Cloreto de tetrabutílfosfónio
[P ₄₄₄₍₁₄₎]Cl	Cloreto de tetradeciltributílfosfónio

1. Introdução

1.1. Anticorpos

Os anticorpos são proteínas que se localizam no plasma e nos fluidos extracelulares, e representam a resposta primária do organismo, constituindo um dos principais efetores do sistema imune adaptativo (1). A sua produção resulta da resposta a determinadas moléculas e organismos (tais como vírus, bactérias, moléculas estranhas e outros agentes) que são neutralizados e/ou eliminados por estes. Os anticorpos são glicoproteínas excretadas pelos linfócitos B especializados (plasmócitos), sendo comumente designados por imunoglobulinas (Igs).

Os anticorpos são constituídos por quatro cadeias polipeptídicas, que se organizam em forma de “Y”, apresentando duas cadeias pesadas (em que cada cadeia corresponde a cerca de 55 kDa) e duas cadeias leves (em que cada cadeia corresponde a cerca de 25 kDa) (1). Cada uma destas cadeias contém várias regiões constantes e uma região variável, associadas entre si por ligações de dissulfureto e ligações não-covalentes, resultando desta forma numa molécula com um peso molecular de aproximadamente 150 kDa, como se pode observar na Figura 1.

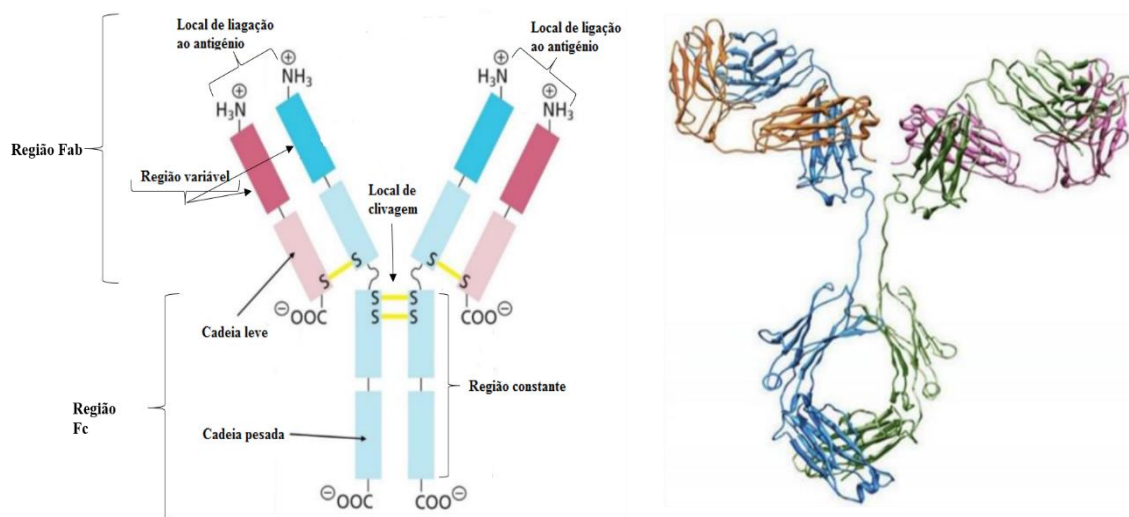


Figura 1 - (A) Representação esquemática de um anticorpo convencional. Este é composto por duas cadeias leves (representadas a vermelho) e duas cadeias pesadas (representadas a azul), formando desta forma uma proteína com uma forma em “Y”. As cadeias pesadas apresentam três secções contantes (azul claro) e uma região variável (azul escuro). As cadeias leves apresentam uma região constante (rosa claro) e uma região variável (rosa escuro). A parte inferior do anticorpo é designada região Fc, à qual se encontram associados dois braços, as regiões Fab. As cadeias leves e pesadas associam-se por ligações de dissulfureto. Os domínios variáveis apresentam regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que ligam diretamente ao antígeno. (B) Representação tridimensional de um anticorpo convencional. As cadeias pesadas encontram-se representadas a verde e a azul, enquanto que as cadeias leves da molécula se encontram representadas a laranja e rosa. Adaptado de Moran *et al.* (2).

O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) trata-se de uma região que permite a ligação do anticorpo ao antígeno através das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), enquanto que o fragmento cristalizável dos anticorpos (Fc) permite que estes se liguem a outros componentes do sistema imunológico, para que haja uma resposta contra o antígeno (3). As CDRs são compostas por diferentes sequências de aminoácidos, uma vez que variam de acordo com o tipo de antígeno a que se associam, e desta forma são designadas de regiões hipervariáveis (3). Já as cadeias pesadas, que se encontram associadas por ligações de dissulfureto, encontram-se localizadas numa região flexível que contém aproximadamente entre 10 a 12 aminoácidos (sendo os mais abundantes a prolina, treonina, serina e cisteína), tratando-se de regiões suscetíveis de clivagem enzimática ou química (4). Cada região globular formada pelo enrolamento das cadeias polipeptídicas resultantes das ligações dissulfureto é designada de domínio. Por outro lado, tanto as cadeias leves como as pesadas contêm regiões constantes (C) e regiões variáveis (V), encontradas nos terminais carboxilo e amino, respetivamente. As cadeias leves contêm uma única região V e uma única região C, enquanto que as cadeias pesadas possuem uma única região V e três regiões C. Uma vez que a unidade central de cada molécula de anticorpo é composta pela região V de uma cadeia leve combinada com uma cadeia pesada, existem dois locais idênticos de ligação ao antígeno. Estas cadeias são responsáveis por determinadas funções, uma vez que as cadeias pesadas permitem dar características ao sistema imune e as cadeias leves permitem definir a especificidade de ligação ao antígeno (3).

Nos mamíferos é possível encontrar cinco classes de Ig, determinadas de acordo com a sequência primária de aminoácidos presente nas cadeias pesadas. As cinco classes de Ig são: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Figura 2). Cada classe de Ig determina um tipo e natureza temporal da resposta imune. Por sua vez, estas classes podem ainda subdividir-se em subclasses – os isotipos – devido aos polimorfismos verificados nas regiões conservadas da cadeia pesada, aplicando-se apenas às classes de IgA e IgG (1). Atualmente, são conhecidos dois isotipos de IgA - IgA1 e IgA2, e quatro de IgG - IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Numa perspetiva bioquímica, biotecnológica e medicinal, a IgG apresenta-se como a classe de anticorpos mais importante, uma vez que corresponde à classe de Igs mais abundantes no sangue de mamíferos (representando 75% dos anticorpos), e corresponde à classe mais representativa de anticorpos terapêuticos (5).

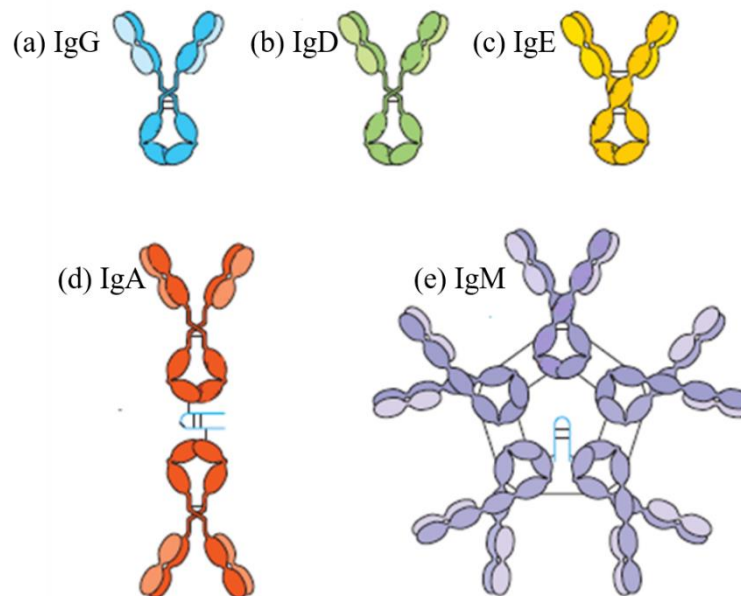


Figura 2 - Estruturas gerais das cinco classes principais de anticorpos. As cadeias leves são representadas pelas tonalidades mais claras, enquanto que as cadeias pesadas são apresentadas pelas tonalidades mais escuras, e as ligações dissulfureto representam-se pelas linhas pretas espessas. A (a) IgG, (b) IgD e (c) IgE são sempre representadas da forma presente na figura. Já as formas poliméricas de IgM e IgA contêm um polipéptido, denominado cadeia J (linha azul), que está ligado por duas ligações dissulfureto à região Fc em dois monómeros diferentes. Assim, a IgM (e) sérica é sempre um pentâmero; enquanto, que a maior parte das IgA (d) séricas existam sob a forma de um monómero, embora dímeros, trímeros e mesmo tetrâmeros estejam por vezes presentes. Adaptado de Owen *et al.* (6)

A interação com o antígeno é fundamental para a função biológica natural do anticorpo, bem como para a sua utilização como um agente de investigação ou terapêutico. A especificidade da resposta de anticorpos é mediada por células T e/ou B através de recetores associados à membrana que ligam o antígeno alvo de uma única especificidade (1). Após a ligação a um antígeno apropriado e consequente desencadeamento de várias cascatas de sinalização, os linfócitos B dividem-se, o que produz células B de memória e clones de plasmócitos secretores de anticorpos. Os linfócitos B da memória permanecem quiescentes até serem subsequentemente ativados pelo seu antígeno específico. Estes linfócitos fornecem a base celular da memória e a resposta resultante dos anticorpos quando reexpostos a um antígeno específico (7).

Assim que a região Fab de um anticorpo se liga ao antígeno, a sua interação com outros ligandos é bloqueada, e é emitido um sinal agonista que desencadeia várias cascatas de sinalização (8). Quando a parte Fab de um anticorpo se liga ao antígeno bloqueia a sua interação com um ligando. A sinalização ocorre quando a ligação do anticorpo a um recetor proporciona um sinal agonista. Estas funções podem ser independentes da região Fc do anticorpo; contudo, as interações entre esta região e outras

moléculas podem acelerar o processo. Dois dos mecanismos pelos quais os anticorpos podem atuar, e que são dependentes da região Fc, são o mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), e/ou o de citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Assim, quando há respostas ADCC, os anticorpos ligam-se a antígenos presentes nas células-alvo e o domínio Fc envolve os receptores Fc que existam à superfície de células efectoras, tais como macrófagos e células exterminadoras naturais (células NK). Estas células, por sua vez, levam a que ocorra a ativação do processo de fagocitose ou lise da célula-alvo. No caso das respostas CDC, verifica-se a ativação da cascata de complemento à superfície da célula, havendo eliminação das células-alvo (8).

Os anticorpos podem ser distinguidos em anticorpos monoclonais (mAbs) e anticorpos policlonais (pAbs), sendo que diferem entre si pelas limitações de utilização de cada tipo de anticorpo (1). A seleção de um determinado tipo de anticorpo recai sobre vários fatores, sendo o mais importante o objetivo para o qual são requeridos, uma vez que cada um apresenta as suas próprias vantagens e desvantagens no que concerne à sua produção, custos e aplicações. Assim uma das principais vantagens dos mAbs é que os torna tão atrativos para fins de investigação, diagnóstico e terapêutica, são a sua homogeneidade e elevada especificidade, permitindo desta forma que ocorram interações específicas com determinadas substâncias (1). Esta especificidade revela-se também bastante atrativa para inúmeros ensaios clínicos e testes de diagnóstico laboratorial como, por exemplo, na deteção e identificação de analitos, marcadores celulares, agentes patogénicos, entre outros (9). No entanto, a sua monoespecificidade pode também ser considerada uma limitação, uma vez que a ocorrência de pequenas alterações na estrutura de um epítopo (como por exemplo, um polimorfismo genético, glicosilação ou desnaturação) pode afetar por completo a função do anticorpo (1). Por fim, uma outra vantagem chave dos mAbs prende-se com o facto de que, depois que o hibridoma desejado tenha sido gerado, estes podem ser produzidos de uma forma constante e renovável, permitindo desta forma um fornecimento contínuo e reproduzível de anticorpos (1). Os anticorpos apresentam inúmeros epítopes que são reconhecidos por um vasto número de linfócitos (10,11). Cada linfócito é ativado de forma a proliferar e a diferenciar-se em plasmócitos, e o anticorpo resultante é policlonal, uma vez que é formada uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes epítopes da proteína. Desta forma, o soro é uma excelente fonte de pAbs, frequentemente produzidos em animais e com a capacidade de reconhecer epítopes independentes no antígeno (1,10). Contrariamente a estes, os mAbs tratam-se de anticorpos produzidos por um único clone

de um linfócito B, resultando numa população de anticorpos idênticos entre si (12). Os mAbs tornaram-se bastante importantes desde que a sua produção foi provada em 1975, através de um trabalho desenvolvido por Köhler e Milstein, permitindo aos autores a obtenção do prémio Nobel da Medicina no ano de 1984 (13). Com o desenvolvimento dos mAbs, verificaram-se avanços na investigação em biomedicina e em biotecnologia, e em áreas de diagnóstico clínico e terapêutico (1).

Atualmente, existem 54 mAbs terapêuticos comercializados pela indústria biofarmacêutica (14), sendo que a IgG se destaca como uma das moléculas efetoras mais potentes para fins terapêuticos. Neste sentido, este anticorpo tem vindo a ser cada vez mais utilizado como biofármaco alternativo às terapêuticas convencionais (15).

1.2.Terapêutica utilizando anticorpos

O desenvolvimento comercial de mAbs terapêuticos começou no início dos anos 80, e o primeiro anticorpo monoclonal terapêutico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização humana foi o Orthoclone OKT3, que obteve a sua aprovação para a prevenção da rejeição de transplante renal (16). Desde a aprovação deste biofármaco, houve um aumento considerável de estudos nesta área de investigação, no sentido de obter novos mAbs terapêuticos, tornando-se uma classe de produtos dominante no mercado biofarmacêutico. Os anticorpos monoclonais atualmente aprovados são utilizados no tratamento de várias doenças, como a hemoglobinúria paroxística noturna, síndromes periódicas associadas à criopirina, diversos tipos de cancros, esclerose múltipla, asma e a artrite reumatoide (16).

Um dos campos da investigação mais ativos, e que recorre frequentemente à utilização de anticorpos, é o cancro, e em especial o cancro da mama, com cerca de um milhão de novos casos diagnosticados por ano (17). Aproximadamente 20% dos casos de cancro da mama apresentam uma alteração adquirida, que resulta na amplificação e sobre-expressão do gene HER2 para que haja o crescimento epidérmico do recetor para este gene. Para o tratamento destes pacientes, recorre-se à utilização de mAbs anti-HER2, que se ligam a um domínio extracelular do HER2 (18,19), visando o bloqueamento da ativação das vias metabólicas subjacentes (20). O primeiro estudo pioneiro nesta área foi o de Baselga *et al.* (21), no qual os autores demonstraram a utilização de um anticorpo monoclonal (ruhMAb) e a remissão completa ou parcial do cancro numa pequena percentagem de pacientes. Em contrapartida, Oliveras-Ferraros *et al.* (22) estudaram os efeitos do biofármaco trastuzumab no cancro da mama, demonstrando que o grupo com resistência

ao fármaco apresentava um fenótipo basal de presença tumoral de HER2 e demonstrava também maior expressão de algumas queratinas basais (22). Da mesma forma, Harris *et al.* (23) sugeriram que a resistência a este tratamento pode estar relacionada com o aumento dos níveis de fatores de crescimento. Desta forma, esta ainda é uma área a ser explorada, pois a produção de mAbs aparenta ser um caminho promissor para novas terapêuticas uma vez que é mais direcionada para a patologia, sendo, no entanto, necessário garantir a sua purificação de forma eficaz e rentável, para que seja garantido a sua eficiência e ausência de problemas secundários para a saúde do paciente.

1.3.Métodos de purificação de anticorpos monoclonais

No processo de produção de mAbs para fins científicos, de diagnóstico ou mesmo de terapêutica, é fundamental garantir uma pureza elevada e adequada do produto final. No entanto, várias proteínas, principalmente as de elevada massa molecular como a albumina, apresentam-se como as impurezas maioritárias dos anticorpos aquando do seu processo de produção (24). Assim, torna-se impreterível o desenvolvimento de um processo de purificação que permita atingir os elevados padrões de pureza requeridos pela indústria farmacêutica (25). Devem ser tidos em conta vários aspetos no desenvolvimento do processo, nomeadamente a rapidez, o rendimento total e a pureza. Para além disso o processo deve ser detentor de vários critérios de produção, como robustez, reprodutibilidade e capacidade de aplicação a uma escala industrial (25). Deste modo, é essencial criar um processo genérico robusto, com um número limitado de etapas, adequado para todos os mAbs, reduzindo o tempo e recursos necessários para o desenvolvimento do processo, e que permita atingir os critérios de pureza, qualidade, eficácia e segurança dos anticorpos terapêuticos. Neste sentido, os métodos utilizados convencionalmente para tal propósito encontram-se discutidos nas secções seguintes desta dissertação, bem como os métodos alternativos que têm vindo a ser desenvolvidos e propostos com o mesmo intuito.

1.3.1. Métodos convencionais

Atualmente, a purificação de mAbs na indústria farmacêutica engloba uma plataforma constituída por seis etapas principais, três das quais recorrem à cromatografia: numa etapa inicial o mAb é capturado através da adsorção a uma resina de afinidade, seguindo-se duas etapas cromatográficas de polimento. O primeiro passo utiliza

habitualmente uma coluna de afinidade com proteína A (proA), devido à sua elevada afinidade para a região Fc do mAb permitindo a sua captura a partir do sobrenadante da cultura celular (26). As etapas subsequentes permitem a remoção de proteínas das células hospedeiras, ácido desoxirribonucleico (ADN), proA que eventualmente se dissocie da coluna, e agregados, e providenciam ainda um nível adequado de remoção viral total (26). Apesar destas três etapas cromatográficas serem fundamentais, são necessárias seis etapas no processo global. Na Figura 3 encontra-se representado um esquema geral de uma plataforma típica de processamento de mAbs, compreendendo as seis etapas fundamentais do processo, nomeadamente a recolha, captura, inativação viral, polimento, remoção viral e concentração por ultrafiltração em modo de diafiltração (UF/DF).

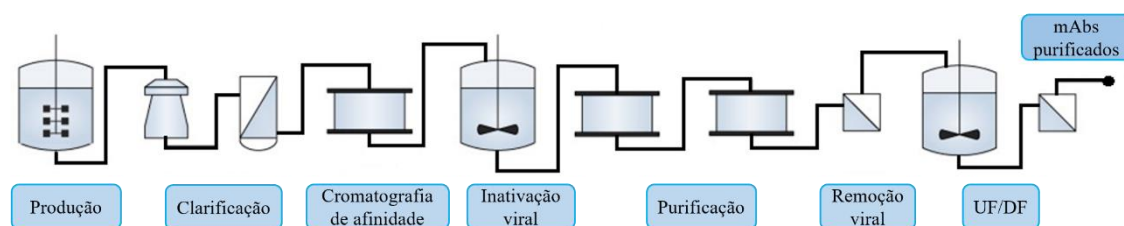


Figura 3 – Plataforma típica de processamento de mAbs. Os sobrenadantes das culturas celulares resultantes do processo são habitualmente purificados através de um processo de captura por cromatografia proA. De modo a remover todos os contaminantes após esta etapa de captura, e de forma a obter uma pureza final em conformidade com as agências reguladoras, são aplicadas duas etapas adicionais de purificação. Adaptado de Rosa *et al.* [2].

A primeira etapa na recuperação de um anticorpo de uma cultura celular mamífera é a clarificação. Uma vez que os mAbs são tipicamente produzidos em culturas celulares mamíferas de elevada densidade, é necessária a remoção das células e dos fragmentos celulares do meio de cultura, de modo a obter um fluido filtrado e clarificado, adequado para a utilização nas etapas cromatográficas subsequentes (27). Nos processos habituais, os meios de cultura de uma linha celular mamífera contêm usualmente 40-50% de sólidos, sendo que, no final do processo de clarificação, é expectável que a concentração de sólidos seja negligenciável. Esta etapa é normalmente concretizada recorrendo a centrifugação, filtração em profundidade ou filtração estéril, embora existam outras abordagens possíveis (27,29). No entanto, é preferida a centrifugação em relação a outras tecnologias de clarificação, pois esta pode ser facilmente aplicada a uma escala industrial, tratando-se também de uma operação unitária económica para grandes volumes (normalmente entre os 2-15000 L por lote) (25).

Após o processo de clarificação, segue-se a etapa de captura do mAb, e para tal recorre-se à cromatografia de afinidade com proA. Esta consiste num polipéptido com ocorrência natural, que se encontra ancorado à parede da bactéria *Staphylococcus aureus*

(28), com um peso molecular de 54 kDa. Porém, é utilizada habitualmente proA recombinante para a purificação de IgG, que apresenta maior vantagem para o processo, uma vez que se trata de uma proteína extracelular excretada na *E. coli*, com uma massa molecular de 42 kDa, desprovida do seu domínio responsável pela ligação à parede celular (28,29). A elevada afinidade da proA para a região Fc de anticorpos tipo-IgG está na base da sua capacidade de purificação (30). O mecanismo de ligação IgG-proA consiste em ligações por pontes de hidrogénio que são estabelecidas em função do pH. Desta forma, a valores de pH alcalino os resíduos de histidina no local de ligação da IgG à proA não se encontram carregados, o que contribui para a sua ligação. Por outro lado, a um pH ácido, esses mesmos resíduos de histidina tornam-se carregados positivamente no mAb e na proA, e como se encontram próximos na área de ligação, repelem-se mutuamente, proporcionando assim a dissociação da IgG da proA, possibilitando a regeneração da coluna para utilização posterior (29,31). A cromatografia proA está reportada como sendo altamente seletiva para anticorpos uma vez que permite obter purezas superiores a 99% num único passo, mesmo a partir de sobrenadantes de culturas celulares complexos (25). No final deste processo os anticorpos encontram-se com uma elevada pureza e mais estáveis devido à eliminação de proteases e outros componentes do meio que podem causar a degradação do produto.

Posteriormente são executadas as etapas de purificação e polimento para que haja uma remoção final das impurezas vestigiais da solução (29). A maioria dos processos de purificação de mAbs inclui pelo menos um passo de cromatografia de troca iónica, de forma a eliminar os agregados de elevada massa molecular, moléculas carregadas, ADN residual, proteínas da célula hospedeira, proA que eventualmente se tenha dissociado da coluna e ainda partículas virais (32). A utilização de cromatografia de troca aniónica (CTA) é mais comum que a utilização de cromatografia de troca catiónica (CTC), pois a sua resina é frequentemente utilizada no modo negativo, uma vez que os mAbs não se ligam à coluna e as impurezas são retidas na mesma (29).

A utilização de células mamíferas na produção de mAbs pode induzir a produção de retrovírus endógenos devido à integração de genomas virais e ocasionalmente essas mesmas células podem ser infetadas por vírus adventícios durante o processo de produção (29). Desta forma, é necessária uma etapa de remoção viral anterior à formulação final do produto. De forma geral, a maioria dos processos de purificação industriais recorrem ao abaixamento do valor de pH para a sua inativação, tirando assim partido do pH ácido utilizado na eluição durante a cromatografia proA, e de uma filtração adicional durante a

etapa de purificação (29). Outras opções de remoção viral incluem a utilização de calor, cromatografia, o uso de solventes/detergentes ou a inativação por radiação ultravioleta (33–35). Finalmente, o processo de purificação termina quando se coloca o produto num tampão de formulação predefinido, o que é usualmente realizado com uma etapa final de ultrafiltração em modo de diafiltração (UF/DF) (29). Nesta etapa recorre-se à utilização de membranas, tais como polietersulfona ou celulose regenerada que apresentam reduzida ligação às proteínas, e são ainda frequentemente adicionados alguns aditivos, como açúcares ou surfactantes (36).

1.3.2. Métodos alternativos

Os métodos alternativos à captura e polimento de mAbs têm surgido essencialmente no sentido de substituir a cromatografia proA, quer por meios cromatográficos alternativos mais económicos (26), ou por meios não-cromatográficos, uma vez que esta etapa cromatográfica contribui significativamente para o elevado custo atual dos mAbs (37). Destas novas tecnologias alternativas, é possível destacar várias estratégias cromatográficas e não-cromatográficas para a purificação de IgG que se encontram resumidas e comparadas em termos de rendimentos e purezas nas Tabelas 1 e 2, respetivamente.

Tabela 1 - Métodos cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.

Métodos cromatográficos				
Métodos de purificação		Rendimento de IgG (%)	Pureza IgG (%)	Referência
3 etapas cromatográficas: CTC, CTA, CIH		85	>99	(38)
CTC (ligando fosfonato)		92-98	95	(39)
CTA com membrana de hidrogel advetivo		>90	>85	(40)
CIH com membranas compostas de PVDF		>97	>97	(41)
Cromatografia anular contínua	(ligando ProA)	77-82	---	(42)
	(ligando Hidroxipatite)	87-92	---	(42)
Cromatografia de adsorção em leito expandido (ligando ProA)		92	98	(43)

Legenda: CIH – cromatografia de interação hidrofóbica; CTA – cromatografia de troca aniónica; CTC – cromatografia de troca catiónica; ProA – proteína A; PVDF – polivinilidino.

Follman *et al.* (38) reportou uma alternativa para a purificação de IgG constituída por 3 etapas cromatográficas, sem recorrer à cromatografia proA, e que engloba uma

cromatografia de troca catiónica (CTC), seguida de uma cromatografia de troca aniónica (CTA), e finalmente de uma cromatografia de interação hidrofóbica (CIH). No entanto, outros autores demonstraram a possibilidade de utilizar com sucesso cada um destes tipos de cromatografia de forma isolada, nomeadamente Clausen *et al.* (39) que referiram a utilização de CTC em conjunto com um ligando de fosfonato, Hou *et al.* (40) que apresentaram a CTA com membrana de hidrogel advetivo, e Ghosh *et al.* (41) que demonstraram que a CIH com membranas compostas de polivinilidino (PVDF) apresentava-se igualmente viável para o efeito. No entanto, também se obtiveram resultados promissores com outros dois métodos cromatográficos acoplados a um ligando, como é o caso da cromatografia anular contínua onde se utilizou um ligando ProA ou um de hidroxiapatite (42). A cromatografia de adsorção em leito expandido foi também reportada como uma técnica promissora utilizando um ligando ProA (43). Desta forma, as principais técnicas utilizadas incluem a cromatografia com uma plataforma de 3 etapas cromatográficas (CTC, CTA e CIH), a cromatografia anular contínua e a cromatografia de adsorção em leito expandido.

Estas alternativas podem ser efetivamente relevantes pois a cromatografia proA requer a utilização de um pH ácido durante a eluição, o que pode promover a degradação da coluna. Utilizando a cromatografia de troca catiónica (CTC), por exemplo, onde não se requer um ambiente com baixo pH, a integridade da coluna mantém-se durante um maior período de tempo (39). Tal como sumariado na Tabela 1, já foi também demonstrado o potencial de aplicação de uma plataforma constituída por três etapas cromatográficas para a purificação de IgG, da qual consta a utilização de CTC (38).

Para que estas novas alternativas cromatográficas conduzam cada vez mais a melhores resultados, é necessário que haja o desenvolvimento de novas gerações de ligandos com afinidade para os mAbs. Neste sentido, já foram explorados fosfonatos ligados a partículas de proA, zirconia, hidroxiapatite e fenilboronato (39), e que podem inclusive, ser conjugados com a utilização de outras variantes cromatográficas, como a CTC (39), a CTA (40) e a CIH (41). Por fim, apesar de ainda não haver informação referente aos níveis de pureza passíveis de se obter no método de cromatografia anular contínua (42), esta tem sido sugerida como uma alternativa viável, assim como a cromatografia de afinidade em leito expandido (43). De um modo geral, a plataforma contendo 3 etapas cromatográficas é a estratégia cromatográfica que se apresenta como mais promissora, pois permite obter elevados rendimentos de extração, com níveis de pureza que permitem atingir os elevados padrões exigidos pela indústria farmacêutica.

Tabela 2 - Métodos não cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.

Métodos não-cromatográficos				
Métodos de purificação	Ligando	Rendimento de IgG (%)	Pureza IgG (%)	Referência
Eletroforese preparativa	---	80	---	(44)
	---	80-90	---	(45)
Membranas de afinidade	Celulose regenerada	---	---	(46)
	Ião metálico quelante	90	FP=33,7	(46,47)
Precipitação de afinidade	Eudragit S-100	68	FP=8	(48)
	GAPDH	98	FP=1,8	(49)
	Hapteno peptídico bivalente	>85	>97	(50)
Separação Magnética Não cromatografica	MagPrepProtein A	---	---	(51)
	Nanopartículas magnéticas termo-sensíveis	94	>98	(52)
	Nanopartículas magnéticas revestidas de amido	69	>99	(53)
SAB	---	97	94	(54)
	---	100	97	(55)

Legenda: FP – fator de purificação; GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; proA – proteína A; SAB – Sistema Aquoso Bifásico.

No mesmo sentido, têm vindo a ser desenvolvidas novas tecnologias não-cromatográficas como estratégias alternativas para a extração e purificação de IgG. Estas incluem a eletroforese preparativa (44,45), filtração por membrana (46,47), precipitação de afinidade (48–50), separação magnética não-cromatográfica (51–53) e os sistemas aquosos bifásicos (56). A eletroforese preparativa pode ser uma alternativa não-cromatográfica promissora, uma vez que o rendimento e pureza de IgG apresentam valores aceitáveis, tal como pode verificar na Tabela 2. Este método não depende de uma interação de ligação variável, tal como acontece nas alternativas cromatográficas, permitindo a sua aplicação a um largo espectro de espécies, além de apresentar um baixo custo associado e potencial para ser aplicado a uma escala industrial (44,45). Já a utilização de membranas de afinidade como adsorventes para a purificação de IgG permite uma boa estabilidade e manutenção dos perfis de adsorção, assim como de eluição ao longo de vários ciclos (46). Outro método utilizado prende-se com o recurso de partículas magnéticas, uma vez que é possível separar os anticorpos em curtos espaços de tempo, e ainda porque são toleradas partículas em suspensão, não havendo necessidade de se efetuar nenhuma filtração ou centrifugação anterior ao carregamento da amostra (52). Por fim, existe uma tecnologia clássica, denominada extração líquido-líquido, que

utiliza habitualmente solventes orgânicos para o efeito (26). Contudo, os solventes orgânicos são na sua maioria muito voláteis e tóxicos, e as proteínas, em particular, apresentam uma baixa solubilidade e uma elevada propensão para desnaturação na presença destes (57). Neste sentido, como técnica alternativa de extração líquido-líquido, surgem os sistemas aquosos bifásicos (SAB), que têm vindo a demonstrar um enorme potencial e versatilidade para o processamento a jusante de biofármacos, como os anticorpos monoclonais, lipoproteínas de elevada densidade, hormonas, citocinas, fatores de crescimento e ADN plasmídico, tal como revisto por Rosa *et al.* (26). Dada a sua relevância neste campo de investigação, esta técnica será discutida em maior profundidade no capítulo seguinte deste documento.

Em suma, apesar de nem todos os métodos permitirem atingir os exigentes critérios que a indústria farmacêutica impõe, alguns apresentam um potencial promissor para os cumprir. Em particular, a plataforma constituída por três etapas cromatográficas (38) permite atingir um elevado grau de pureza (> 99%) de IgG, tal como a separação magnética através da utilização de nanopartículas que recorre apenas a uma operação unitária de extração (53), tratando-se de uma vantagem relativamente às três etapas da proposta cromatográfica.

1.4.Sistemas aquosos bifásicos (SAB)

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) apresentam-se como um método alternativo de extração/purificação de mAbs extremamente promissor, tal como foi referido anteriormente. Estes sistemas são maioritariamente constituídos por água, proporcionando consequentemente um ambiente mais biocompatível para as biomoléculas de interesse.

No ano de 1896, Beijerinck reportou pela primeira vez a incompatibilidade e formação de duas fases aquosas de soluções de agar com amido ou gelatina solúvel (58). Contudo, só em 1955, é que os SAB foram reportados como técnica de extração/separação por Albertsson *et al.* (59), que demonstrou que o polietilenoglicol (PEG), fosfato de potássio e água, assim como PEG, dextrano e água, formavam duas fases aquosas imiscíveis em determinadas concentrações. É de referir que ambos os solutos que constituem um SAB devem ser miscíveis em água e que a formação do sistema ocorre acima de uma determinada concentração dos mesmos (60). É possível formar SAB constituídos por dois polímeros, por exemplo PEG e dextrano, ou um polímero e um sal,

por exemplo PEG e fosfato de sódio, ou mesmo outro tipo de combinações, nomeadamente líquido iónico (LI) e sal (60).

As principais vantagens inerentes à utilização dos SAB estão relacionadas com o facto de se tratar de uma técnica relativamente simples, com um baixo custo associado, fácil de operar e de aplicação viável a uma escala industrial, com uma elevada capacidade de resolução, e que permitem que a purificação e concentração sejam integradas numa única etapa (26). Estes também proporcionam um ambiente biocompatível, pois ambas as fases são constituídas por um elevado teor de água e os polímeros utilizados permitem habitualmente que ocorra a estabilização da estrutura terciária das proteínas, preservando a sua atividade biológica (61). Dadas todas estas vantagens, os SAB já revelaram ser uma ferramenta não-cromatográfica eficaz para a separação e purificação de biomoléculas, nomeadamente células, vírus, organelos, ácidos nucleicos, lípidos, aminoácidos, proteínas, anticorpos e enzimas (26).

A partição seletiva de um determinado produto entre as duas fases coexistentes encontra-se na base dos SAB como processo de separação (26). Esta partição é controlada por vários parâmetros relacionados com as propriedades do sistema, do soluto-alvo e das interações entre os dois. No que diz respeito às propriedades do sistema que influenciam a partição, destaca-se a natureza dos constituintes e concentração, pH do sistema e força iónica; relativamente às propriedades do soluto-alvo envolvidas na partição, é possível salientar a carga, peso molecular, hidrofobicidade e características conformacionais. A complexidade das interações químicas e físicas envolvidas no processo de partição torna estes sistemas bastante poderosos em contraste com outras técnicas de separação estabelecidas, uma vez que é possível atingir um elevado poder de resolução apenas através da manipulação das propriedades intrínsecas do sistema (24). Contudo, toda esta complexidade dos sistemas, aliada ao facto de os mecanismos de partição serem ainda pouco compreendidos, prejudicam a previsão da eficácia de um determinado SAB (62).

Cada SAB tem um único diagrama de fases sob um conjunto particular de condições, tais como a temperatura e o pH (61). De uma maneira esquemática, como representado na Figura 3, a curva binodal (A-B-C-D) separa duas regiões: a região monofásica (abaixo da curva), em que o sistema apresenta uma única fase homogénea, e a região bifásica (acima da curva), onde ocorrem duas fases aquosas imiscíveis (60). Ainda é possível identificar o ponto M, que corresponde a uma composição de mistura na região bifásica, e cuja composição de cada fase adquire a designação B e D, uma vez que são os pontos terminais de uma *tie-line* (TL). Ao longo da mesma TL apenas se difere a

composição total do sistema e a razão volumétrica das fases, mas mantém-se a composição exata das duas fases coexistentes (B e D) (61). Também é possível retirar outra informação a partir do diagrama de fases – o comprimento da *tie-line* (TLL) – que é um indicador numérico da diferença da composição entre as duas fases e é utilizado para correlacionar tendências na partição dos solutos entre ambas as fases (60).

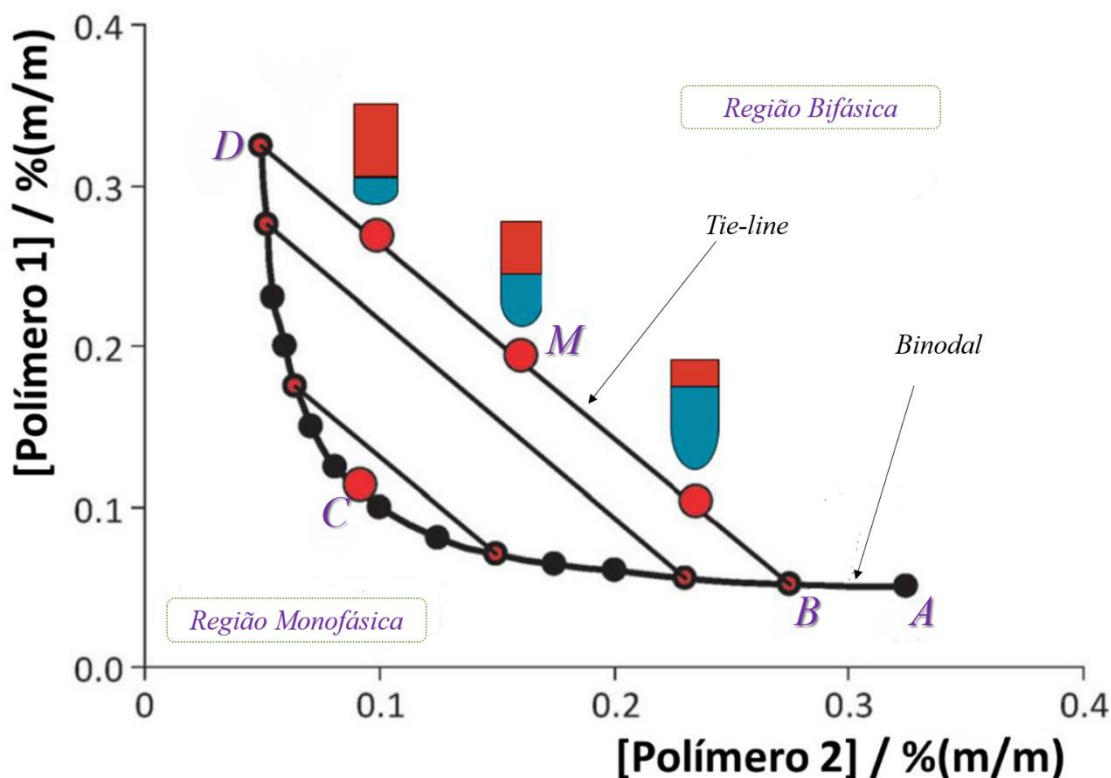


Figura 4 - Representação esquemática de um diagrama de fases hipotético constituído por dois polímeros (polímero 1 polímero 2). A curva binodal está representada pelos pontos A-B-C-D, e separa a região monofásica da região bifásica. Os pontos B-M-D representam uma *tie-line*, que para um qualquer ponto de mistura ao longo desta, a composição exata das fases superior e inferior do SAB serão sempre D e B, respetivamente. A razão volumétrica das duas fases coexistentes encontra-se representado graficamente junto de cada ponto da *tie-line*. Adaptado de Freire *et al.* (60).

O primeiro estudo que sugeriu a utilização de SAB para a purificação de anticorpos foi proposto por Andrews *et al.* (63), em 1990, utilizando PEG modificado com proA como um dos constituintes do sistema. A escolha deste ligando foi baseada na propriedade interessante que a proA apresenta para a separação e purificação de IgG. Porém, a baixa disponibilidade e os custos deste ligando inviabilizaram o trabalho proposto numa escala mais alargada (63). Posteriormente, Sulk *et al.* (64), em 1992, propuseram um SAB constituído por PEG 1540 e fosfato de potássio acoplado à cromatografia de adsorção tiofílica, de modo a que estas duas etapas permitissem o isolamento de IgG. De facto, foi possível recuperar o anticorpo na fase superior do sistema, com um rendimento de IgG de 90% (64). Com o decorrer dos estudos nesta área,

Andrews *et al.* (65) demonstraram que era possível formar um SAB do tipo polímero-sal para a recuperação de IgG de rato, com uma etapa de extração seguida de uma etapa de re-extração, a partir de sobrenadantes de células de hibridoma. Uma vez mais, a extração de IgG foi conseguida para a fase rica em PEG, num SAB constituído por PEG 1450 e com baixa concentração de fosfato de potássio (14%) e NaCl (12%), levando à obtenção de um rendimento de 90% e com um fator de pureza de 2,7. Posteriormente, os autores re-extraíram a IgG para uma solução de fosfato de potássio, e os compostos contaminantes mais hidrofóbicos que se particionaram com a IgG foram removidos por cromatografia de interação hidrofóbica (65). Mais tarde, Rito-Palomares *et al.* (66) estudaram um SAB constituídos por PEG 1000 e fosfato de potássio a pH 9 e a pH 6,5 para o processamento de sangue de bovino numa abordagem que compreende duas etapas: extração e re-extração. Através desta abordagem, foi possível verificar que as proteínas solúveis como a albumina de soro bovino (BSA), hemoglobina e IgG particionam maioritariamente para a fase superior rica em PEG, enquanto os fragmentos celulares particionam maioritariamente para a fase inferior rica em sal. Através do processo de re-extração de IgG foi possível provar a reciclagem da fase rica em PEG até 5 ciclos consecutivos (66).

Mais recentemente, outros investigadores sugeriram novos métodos de separação e purificação de IgG baseados em SAB a partir de diversas matrizes. É importante destacar a investigação de Hye-Mee Park *et al.* (67), que sugeriram um novo método de separação por afinidade, no qual a peroxidase do rábano (HRP) associada à IgG humana foi utilizada como ligando de afinidade. Neste estudo, os melhores resultados foram obtidos utilizando um SAB do tipo PEG/dextrano, que permitiu a obtenção de um rendimento de 91% e um nível de pureza de 88% da IgG (67). Vargas *et al.* (68) reportaram um novo método de fracionamento de plasma humano congelado (contendo IgG e albumina) utilizando PEG 3350, fosfato de potássio e NaCl a pH 6,1. Através deste sistema, foi possível uma recuperação de IgG de 70% e uma pureza de 92% na fase superior rica em PEG, verificando-se a partição da albumina para a fase oposta com rendimento e pureza de 91% e 90%, respetivamente. Este estudo apresenta-se bastante promissor, uma vez que permite provar uma partição seletiva das duas proteínas maioritárias presentes em culturas celulares, e pode mesmo representar uma tecnologia interessante de fracionamento de plasma (68). Já no ano de 2015, os mesmos autores aplicaram com sucesso SAB como etapa primária de purificação de IgG de cavalo anti-soro antiofídico (69). Wu *et al.* (70) constataram que o sistema constituído por PEG 4000,

hidroxipropil amido (HPS) e NaCl a pH 8 constitui também uma alternativa promissora para a recuperação primária de IgG a partir de uma matriz complexa, uma vez que obtiveram um rendimento de extração de 84% com um fator de purificação de 5,73 (70). Também no ano de 2015, Muendges *et al.* (71,72) publicaram dois trabalhos referentes à extração e purificação de IgG proveniente de linhas celulares obtidas a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO), utilizando um sistema PEG 2000 e fosfato de sódio/potássio a pH 6, obtendo um rendimento de IgG 88% e pureza 95% (71), com a reciclagem das fases e com o potencial de extração contínua.

É ainda importante referir um dos grupos com maior relevância internacional na área da engenharia da bioseparação de mAbs, o grupo de Aires-Barros e seus colaboradores, que tem vindo a reportar o sucesso da utilização de SAB para a extração de anticorpos de diferentes sobrenadantes de linhas celulares, nomeadamente de células de hibridoma e de células CHO (24,54,55,73–86). O trabalho destes investigadores permite a compilação de uma série de resultados promissores, os quais se encontram apresentados e compilados na Tabela 3 (24,54,55,73–86). O enorme potencial dos SAB para a purificação de anticorpos a partir de matrizes reais foi demonstrado por este grupo de investigação utilizando sistemas PEG/fosfato de potássio (24,55,75–78), PEG/citrato de sódio (79,80), PEG/dextrano (54,73,74,81–84,86), e UCON/dextrano (85).

Tabela 3 - SAB investigados por Aires-Barros e colaboradores (24,54,55,73–86) para a extração e purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.

Composição do SAB	Origem de IgG	Rendimento de extração IgG %	Pureza de IgG %	Ref
PEG 150-AG + dextrano 500 kDa	CHO	93	FP=1,9	(82)
10% PEG 3350-AG + 5% dextrano 500 kDa 2 etapas: SAB com ligando + CTC	CHO	73	91	(83)
8% PEG 3350-AG + 5% dextrano 500 kDa + 10mM fosfato de potássio, pH 7	CHO	97	94	(54)
8% UCON 2000 + 6% dextrano 500 kDa + 20% TEG-AG 2 etapas: extração e re-extração	CHO	85	88	(81)
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500 kDa + 1,3% TEG-AG, pH 4	CHO	96	43	(84)
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500 kDa + 1,3% TEG-AG, pH 4 5 etapas: SAB + 4 etapas de contra-corrente	CHO	95	85	(84)
8% UCON 50HB-3520 + 5% dextrano 500 kDa, pH 5 2 etapas: extração e re-extração	-	82	-	(85)
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500 kDa + 300 mM NaCl, pH 3	HIB	72	-	(73)
7% PEG 6000 + 5% dextrano 500 kDa + 150 mM NaCl, pH 3	HIB	84	-	(73)
8% PEG 3350 + 5% dextrano 500 kDa + 200 mM NaCl + partículas revestidas por goma-arábica modificadas com ácido aminofenil borônico	CHO	92	98	(86)
PEG 3350 + fosfato de potássio + NaCl, pH 6 3 etapas: extração, re-extração e lavagem	CHO	80	97	(55)
PEG 3350 + fosfato de potássio + NaCl, pH 6 3 etapas: extração, re-extração e lavagem	PER C6	100	97	(55)
8% PEG 3350 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	MA	76	100	(24)
12% PEG 6000 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	CHO	88	FP=4,3	(75)
12% PEG 6000 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	HIB	90	FP=4,1	(75)
8% PEG 3350 + 10% fosfato de potássio + 10% NaCl, pH 6 5 etapas: SAB + 4 etapas de contra-corrente	CHO	89	75	(76)
PEG 3350 + fosfato de potássio Escala piloto de extração contínua com SAB em contra-corrente	CHO	85	50	(77)
10% PEG 3350 + 12% citrato de sódio, pH 6 3 etapas: SAB + CIH + CEM	CHO	90	100	(79)
8% PEG 3350 + 8% citrato de sódio + 15% NaCl, pH 6	HIB	99	76	(80)
7% PEG 350 + 6% dextrano + ligando duplo LYTAG-Z	-	89	42	(74)

Legenda: AG – ácido diglutárico; CEM – cromatografia de exclusão molecular; CHO – células de ovário de hamster chinês; CIH – cromatografia de interação hidrofóbica; CTC – cromatografia de troca catiônica; FP – fator de purificação; HIB – células de hibridoma; MA – mistura artificial; PEG – polietileno glicol; TEG-AG – trietileno glicol-ácido diglutárico; UCON – óxido de etileno/óxido de propileno.

Aires-Barros e seus colaboradores demonstraram também que os SAB podem ser integrados num processo envolvendo etapas cromatográficas de CIH e cromatografia de exclusão molecular (CEM) (79), e é também possível a aplicação de etapas de re-extração e purificação (80). No sentido de melhorar a especificidade da IgG para a fase rica em PEG, o mesmo grupo de investigação estudou a utilização de PEG funcionalizado com diversos ligandos (54,74,82,83), ou incluindo o trietileno glicol-ácido diglutárico (TEG-AG) (81,84), o que permitiu aumentar a seletividade do sistema para a IgG e obter elevados rendimentos de extração. Incluído na versatilidade das técnicas aplicadas para a purificação de IgG, encontra-se também um processo híbrido que combina a extração através de SAB com a separação magnética (86).

Num dos trabalhos mais recentes deste grupo, os autores utilizaram um novo ligando com dupla afinidade, a LYTAG-Z (74), que se revelou um ligando capaz de potenciar a técnica de SAB como alternativa eficiente às resinas convencionais de proteína A. Para além dos resultados promissores no que diz respeito à extração de IgG, a possibilidade de recuperar o ligando para posterior utilização é também uma grande vantagem desta abordagem, sendo que, idealmente, a recuperação poderia ser efetuada numa segunda extração por diminuição do pH do sistema para valores inferiores a 3 para quebrar a ligação de IgG ao domínio Z e deslocar a partição de anticorpos de volta para a fase inferior (74).

Como se pode constatar, foram atingidos resultados promissores com a utilização de SAB na purificação de IgG proveniente de diversas matrizes complexas, nomeadamente de matrizes biológicas e de sobrenadantes de linhas celulares. Os resultados já reportados podem, contudo, ser alvo de melhorias, através da exploração de diferentes valores de pH, ligandos, etapas adicionais de purificação, e principalmente através da utilização de aditivos nos SAB que permitam refinar a seletividade dos sistema para a molécula-alvo em causa.

1.4.1. Líquidos iónicos e aplicações nos SAB

Os líquidos iónicos (LIs) são sais que se encontram no estado líquido a temperaturas inferiores a 100°C, e que se apresentam como solventes promissores no desenvolvimento de técnicas de separação/purificação (87,88). Devido à sua natureza iónica, os LIs apresentam algumas propriedades interessantes, tais como volatilidade negligenciável, não são inflamáveis, possuem elevada condutividade iónica e elevada estabilidade

térmica e química (89). Em particular, a sua baixa volatilidade e o facto de não serem inflamáveis contribuíram para a sua designação de “*green solvents*”. Quanto à sua constituição, estes são normalmente compostos por um catião orgânico assimétrico de elevadas dimensões, e por um anião de natureza orgânica ou inorgânica com dimensões mais reduzidas. Através de uma manipulação apropriada do catião e do anião que constituem o LI, é possível obter inúmeras combinações destes, abrangendo deste modo, um espectro mais alargado de polaridades, razão pela qual estes solventes são também designados como “*designer solvents*” (90). Em suma, e idealmente, os LIs podem ser seleccionados de modo que não conduzam a alterações da estrutura secundária/terciária das proteínas (91). Quando utilizados como constituintes dos SAB, estes já demonstraram uma elevada performance, através da obtenção de extracções completas num único passo (92), elevada seletividade para uma determinada molécula-alvo em matrizes complexas (93), ou através da utilização de LIs de natureza biocompatível capazes de manter a estrutura das proteínas (91). Para além disso, também já foi provada a possibilidade de obter uma gama mais alargada de polaridades dos SAB, através da adição de pequenas quantidades de LIs aos SAB convencionais constituídos por um polímero e um sal inorgânico, o que permite manipular seletivamente a partição das biomoléculas (94–96). Deste modo, é possível concluir que a utilização de LIs permite efetivamente aumentar a gama de polaridades e aumentar a afinidade de determinadas biomoléculas para as fases coexistentes dos SAB, permitindo assim a manipulação da sua partição. Pereira *et al.* (94) demonstraram que a partição do L-triptofano é dominada pelo LI utilizado como adjuvante, a apenas 5% (m/m), e que a utilização deste permitiu atingir coeficientes de partição superiores a 25. Os autores também constataram que a partição é muito dependente do LI utilizado, onde o catião do LI apresenta o papel principal no controlo da capacidade de extração da biomolécula para a fase rica em PEG. A temperatura nestes sistemas com LIs como adjuvantes também influencia a eficiência de extração de aminoácidos e proteínas, tal como verificado por Pei *et al.* (97). Hamzehzadeh *et al.* (98,99) investigaram o potencial do LI brometo de 1-butil-3-metilimidazólio, utilizado como adjuvante a 5% (m/m), em SAB constituídos por $K_3C_6H_5O_7$ e por PEG de diferentes pesos moleculares (400 g.mol⁻¹ (98) e 600 g.mol⁻¹ (99)) para a extração de L-triptofano. Nestes estudos, os resultados demonstraram que a adição de pequenas quantidades de LI permitem melhorar consideravelmente os coeficientes de partição da biomolécula para a fase rica em polímero. Almeida *et al.* (95) utilizaram SAB constituídos por PEG e Na₂SO₄, com LIs como adjuvantes, e avaliaram a sua performance na extração de

antioxidantes. Os autores demonstraram que a manipulação da estrutura química do LI é determinante para a obtenção de elevadas eficiências de extração (compreendidas entre 80% e 99%). No mesmo sentido, Souza *et al.* (96) investigaram o impacto de vários LIs na formação de SAB igualmente constituídos por PEG e um sal inorgânico, demonstrando elevados coeficientes de partição do ácido clorânico e rodamina 6G para a fase rica em PEG na presença de LI. Deste modo, é possível concluir que a utilização de LIs, mesmo que como adjuvantes e/ou em pequenas quantidades, permite ajustar as polaridades e afinidades de ambas as fases de SAB, permitindo assim a manipulação da partição das (bio)moléculas-alvo. Face ao exposto, e uma vez que ainda não existem trabalhos reportados na literatura utilizando LIs como adjuvantes em SAB para a extração de IgG, neste trabalho foi explorada esta possibilidade. Em particular, foi caracterizada e avaliada a potencialidade dos LIs como alternativas aos eletrólitos mais convencionais em SAB do tipo polímero/polímero visando o desenvolvimento de um bioprocessamento mais eficiente para o processamento de mAbs a partir de sobrenadantes de culturas celulares.

2. Materiais e métodos

2.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8

2.1.1. Linha celular e meio de cultura

Os anticorpos monoclonais anti-interleucina-8 humana (anti-IL-8) foram obtidos através de uma linha celular CHO DP-12 clone #1934 (ATCC CRL-12445) da *American Tissue Cell Collection* (ATCC). Para tal, foi utilizado o método de seleção DHFR-/metotrexato que foi realizado de acordo com a patente americana #6133426 (patente europeia EP 1415998), tratando-se de um clone derivado da transfeção de células CHO DP-12 com o vetor p6G4V11N35E.choSD.10 e selecionadas em metotrexato.

As células CHO DP-12 cresceram em meio de cultura a 75% (v/v) isento de soro (ProCHO™5, Lonza Group Ltd, Bélgica) e 25% (v/v) de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco®, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino com muito baixo teor em IgG (FBSUL, Gibco®). O meio de cultura continha 200 nM de metotrexato de forma a manter a pressão seletiva. O meio de cultura ProCHO™5 foi suplementado com 4 mM L-glutamina (Gibco®), 2,1 g/L NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10 mg/L insulina humana recombinante (Lonza), 0,07% (v/v) lípidos (Lonza) e 1% (v/v) antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estrepto

micina) (Gibco®). O meio de cultura DMEM utilizado continha 4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio. Após a ressuspensão do pó de DMEM, adicionou-se 1,5 g/L NaHCO₃, 2 mg/L insulina recombinante humana, 35 mg/L L-prolina (todos adquiridos através da Sigma-Aldrich), 0,1% (v/v) de um elemento vestigial A, 0,1% (v/v) de um elemento vestigial B (ambos da Cellgro®, Manassas, VA, EUA) e 1% (v/v) antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL streptomycin) (Gibco®).

2.1.2. Passagem celular

As culturas cresceram em frascos T-75 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) a 37 °C (± 1 °C) e 5% de CO₂, com uma densidade celular inicial de $2,1 \times 10^6$ células/mL. As passagens celulares foram realizadas a cada 4 dias, em condições de máxima assepsia numa câmara de fluxo laminar. Em cada passagem, os sobrenadantes celulares foram coletados para tubos BD Falcon™ e sujeitos a centrifugação a 1250 rpm durante 8 minutos, período após o qual foram transferidos para um novo tubo BD Falcon™ e

armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). As células foram lavadas com uma solução salina aquosa tamponizada a pH 7,4, designada PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Gibco®), e dissociadas do frasco T-75 pela adição de uma solução de Acutase (Sigma-Aldrich) por 5 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). A suspensão celular foi centrifugada a 1250 rpm durante um período de 8 minutos num tubo BD Falcon™, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso em novo meio de cultura, sendo retirada uma alíquota para o processo de contagem celular. O número de células presentes na cultura após os 4 dias de crescimento foi determinado através de um hemacitómetro e utilizando um microscópio ótico Leica DMLB (Wetzlar, Alemanha), através do método de exclusão do azul de tripano (Gibco®). A suspensão celular foi posteriormente cultivada num novo frasco T-75, numa densidade celular de $2,1 \times 10^6$ células/mL, sendo então transferida para uma incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 5% de CO_2 . A cultura celular foi mantida por várias semanas, sendo que em cada passagem foi determinada a densidade celular (Equação 1):

$$DC = N^{\circ} \text{ células vivas} \times FD \times 10^4 \quad (1)$$

em que DC representa a densidade celular e FD refere-se ao fator de diluição em causa.

2.2. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H_2O + LI

2.2.1. Reagentes químicos

Os sistemas de duas fases líquidos utilizados neste trabalho foram estabelecidos através da utilização de uma solução aquosa de PEG com uma massa molecular de 3350 Da, abreviado como PEG 3350, e de uma solução de dextrano com uma massa molecular de 500000 Da, abreviado como dextrano 500 kDa, ambos obtidos através da Sigma-Aldrich. Os polímeros foram utilizados sem qualquer passo prévio de purificação.

Foram estudados catorze LIs como adjuvantes no sistema constituído por PEG + Dextrano + H_2O , nomeadamente: o cloreto de tetrametilamónio, $[\text{N}_{1111}]\text{Cl}$ (pureza superior a 97%); o cloreto de tetrabutílamónio, $[\text{N}_{4444}]\text{Cl}$ (pureza superior a 97%); o cloreto de tetrabutílfosfónio, $[\text{P}_{4444}]\text{Cl}$ (sem informação relativamente à pureza); o cloreto de tetradecil-tributílfosfónio, $[\text{P}_{444(14)}]\text{Cl}$, o cloreto de 1-butil-4-metilpiridínio, $[\text{C}_4\text{mpy}]\text{Cl}$ (pureza superior a 98%); o cloreto de colina, $[\text{Ch}]\text{Cl}$ (pureza superior a 98%); o acetato de colina, $[\text{Ch}][\text{Ac}]$ (pureza superior a 99%); o butanoato de colina, $[\text{Ch}][\text{But}]$ (pureza superior a 99%); o dihidrogénio fosfato de colina $[\text{Ch}][\text{DHP}]$ (pureza superior a 99%); o bitartarato de colina $[\text{Ch}][\text{Bit}]$ (pureza superior a 98%); o bis(trifluorometilsulfonilamida)

de colina, [Ch][NTf₂], o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]Cl (pureza superior a 99%); o brometo de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]Br (pureza superior a 99%); e o hidrogenosulfato de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim][HSO₄] (pureza superior a 99%). Todos os LIs foram fornecidos pela Iolitec, à exceção do [N₁₁₁₁]Cl, do [N₄₄₄₄]Cl e da [Ch][Bit] que foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, o [Ch]Cl que foi fornecido pela Acros Organics, e o [P₄₄₄₄]Cl que foi providenciado pela Cytec Industries Inc. As estruturas químicas dos LIs estudados encontram-se representadas na Figura 5.

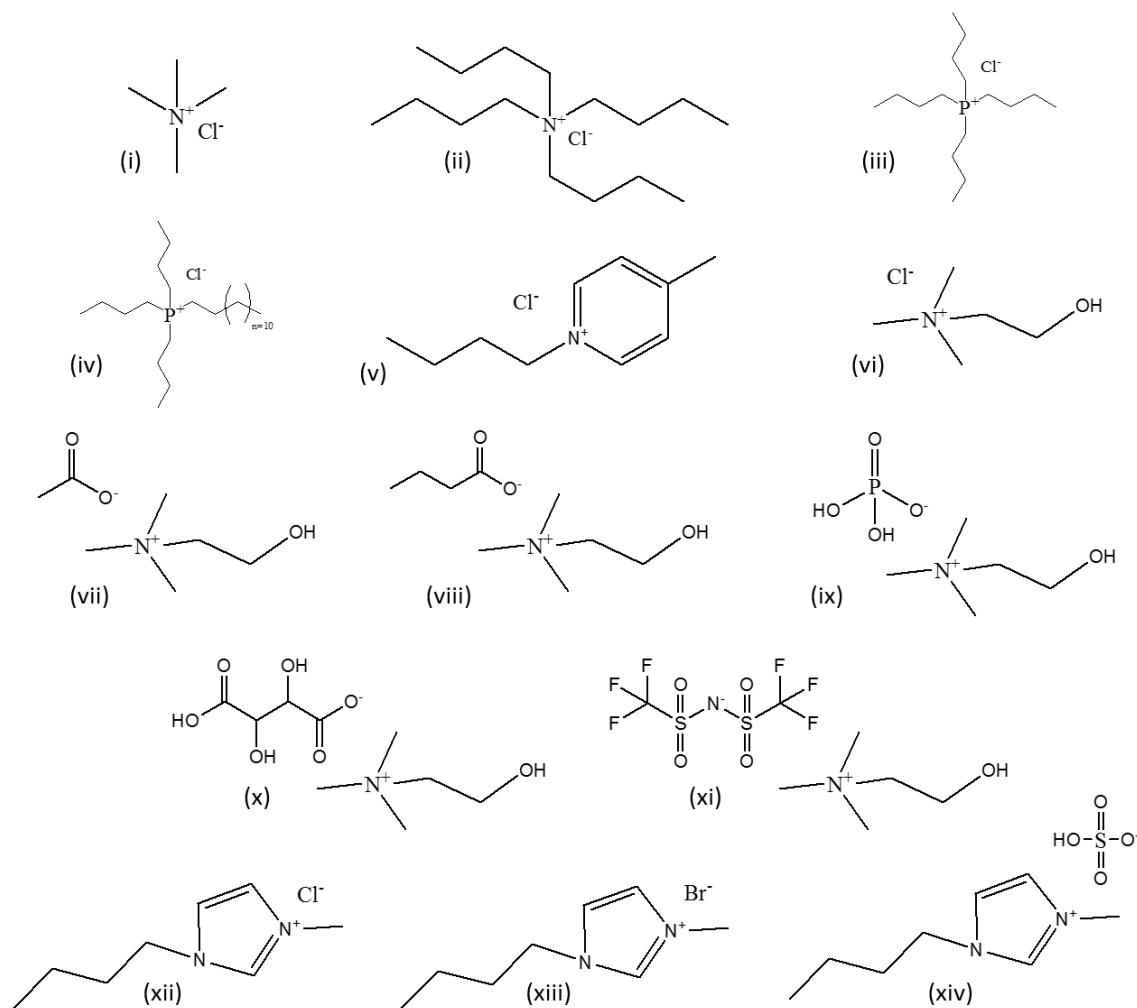


Figura 5 - Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes nos sistemas PEG+Dextrano+H₂O: (i) [N₁₁₁₁]Cl; (ii) [N₄₄₄₄]Cl; (iii) [P₄₄₄₄]Cl; (iv) [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl; (v) [C₄mpy]Cl; (vi) [Ch]Cl; (vii) [Ch][Ac]; (viii) [Ch][But]; (ix) [Ch][DHP]; (x) [Ch][Bit]; (xi) [Ch][NTf₂]; (xii) [C₄mim]Cl; (xiii) [C₄mim]Br; (xiv) [C₄mim][HSO₄].

As amostras individuais de LIs foram secas sob agitação constante em vácuo e a uma temperatura de aproximadamente 50 °C (± 1 °C), por pelo menos 24 horas, de modo a reduzir o teor de água e o conteúdo de compostos voláteis para valores negligenciáveis. Após este processo, a pureza de cada LI foi confirmada por RMN de ¹H e ¹³C, e verificou-se estar de acordo com a pureza indicada pelos fornecedores.

O material necessário para a análise por SDS-PAGE inclui: solução de acrilamida/bisacrilamida 40% obtida a partir da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA); tris(hidroximetil)aminometano, PA da Pronalab; dodecilsulfato de sódio, SDS, com pureza superior a 98,5% (m/m) e glicina obtidos na Sigma-Aldrich; persulfato de amônio (APS) e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) igualmente obtidos na Sigma-Aldrich; 4x Laemmli Sample Buffer adquirido na Bio-Rad (Hercules, CA, EUA); solução de DL-ditiotreitol 1M em água, DTT, obtido na Sigma-Aldrich; azul brilhante de Coomassie R sob a forma de pastilhas solúveis (nome comercial: PhastGel® Blue R) adquirido na Sigma-Aldrich; etanol da Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL, EUA); ácido acético (CH₃COOH) 100% puro glacial obtido na Merck; e marcador *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* adquirido na Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

Para a quantificação das proteínas totais utilizou-se o método de Bradford. Para tal, o Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay foi adquirido na Thermo Scientific Pierce. O padrão de albumina de soro bovino (BSA) foi adquirido em ampolas, com uma concentração de 2 mg/mL, através da Thermo Scientific Pierce.

2.2.2. Reagentes biológicos

Os estudos acerca da potencialidade de extração e purificação dos sistemas em estudo para IgG a partir da matriz real foram realizados utilizando sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12, produzidos de acordo com o procedimento experimental descrito no capítulo 2.1. desta dissertação, tratando-se de uma matriz complexa contendo anticorpos anti-IL-8.

2.2.3. Procedimento experimental para a caracterização do sistema

2.2.3.1. Determinação dos diagramas de fase

A curva binodal do diagrama de fases do sistema ternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O foi primeiramente determinada e comparada com a já reportada na literatura (59). De seguida foram determinadas as curvas binodais para os sistemas quaternários consitutidos por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, uma vez que estes ainda não se encontram descritos na literatura. As curvas binodais foram determinada pelo método de titulação turbidimétrica a 25 °C (\pm 1 °C) e à pressão atmosférica (100). Foram preparadas soluções aquosas de dextrano a 25% (m/m), de PEG

a 50 % (m/m) e H₂O, todas com LI a 1% (m/m), 5% (m/m) e 10% (m/m) consoante o caso em estudo, e utilizadas para a determinação dos diagramas de fase. Foi efetuada a adição repetitiva, e gota a gota, da solução aquosa de dextrano à solução de PEG até à deteção de uma solução turva, correspondente à região bifásica, seguida da adição gota a gota de água milli-Q até se detetar uma solução límpida, que indica a entrada na região monofásica (2). Estas adições gota a gota foram realizadas perante agitação constante. A composição dos sistemas quaternários foi determinada pela quantificação gravimétrica de todos os componentes adicionados, com uma incerteza de $\pm 10^{-4}$ g. Também se realizou o procedimento inverso, ou seja a adição repetitiva e gota a gota da solução aquosa do PEG à solução aquosa de dextrano até à deteção de uma solução turva, seguida da adição gota a gota de água até se detetar novamente uma solução límpida, de forma a obter diagramas de fase mais completos.

As TLs foram determinadas por um método gravimétrico originalmente descrito por Merchuk *et al.* (101). Para tal, foram preparadas gravimetricamente misturas de PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI na região bifásica, e de seguida vigorosamente agitadas. Para que ocorresse a separação das fases e a mistura atingisse o equilíbrio, as mesmas foram centrifugadas a 3500 rpm durante um período de 30 minutos, numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf). Após a etapa de separação, pesaram-se ambas as fases. Finalmente, cada TL foi determinada individualmente pela aplicação da regra da alavanca que traduz uma relação entre o peso da fase de topo e a composição total do sistema. A curva binodal experimental foi ajustada primeiramente utilizando a Equação 2 (101):

$$[PEG] = A \exp[(B[dextrano]^{0,5}) - (C[dextrano]^3)] \quad (2)$$

em que [PEG] e [dextrano] são, respetivamente, a percentagem mássica de PEG e de dextrano, e A , B e C são constantes obtidas pela regressão.

Para a determinação das TLs, resolveu-se o seguinte sistema constituído por quatro equações (Equações 3 até 6) e quatro incógnitas ($[PEG]_{PEG}$, $[PEG]_{dextrano}$, $[dextrano]_{PEG}$ e $[dextrano]_{dextrano}$):

$$[PEG]_{PEG} = A \exp[(B[dextrano]_{PEG}^{0,5}) - (C[dextrano]_{PEG}^3)] \quad (3)$$

$$[PEG]_{dextrano} = A \exp[(B[dextrano]_{dextrano}^{0,5}) - (C[dextrano]_{dextrano}^3)] \quad (4)$$

$$[PEG]_{PEG} = \frac{[PEG]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [PEG]_{dextrano} \quad (5)$$

$$[dextrano]_{PEG} = \frac{[dextrano]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [dextrano]_{dextrano} \quad (6)$$

As designações subscritas *PEG*, *dextrano* e *M*, representam a fase de topo, fase de fundo e ponto de mistura, respetivamente. O parâmetro α representa a razão entre a massa da fase de topo e a massa total da mistura. A resolução do sistema referido anteriormente permite-nos obter a concentração de PEG e de dextrano nas fases de topo e de fundo.

Finalmente, para o cálculo das *tie-line lengths* (TLLs), foi aplicada a Equação 7.

$$TLL = \sqrt{([dextrano]_{PEG} - [dextrano]_{dextrano})^2 + ([PEG]_{PEG} - [PEG]_{dextrano})^2} \quad (7)$$

2.2.4. Procedimento experimental para a extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO

2.2.4.1. Preparação dos SAB

Inicialmente foi necessária a produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8 através de tecnologia celular mamífera de acordo com o procedimento apresentado no capítulo 2.1. desta dissertação. Os sobrenadantes das culturas celulares contendo os anticorpos monoclonais foram então utilizados diretamente na preparação dos SAB com o propósito de extração e purificação de IgG. Para tal, preparam-se SAB em eppendorfs, com uma massa final de 2 g, através da pesagem das quantidades apropriadas dos componentes a partir de soluções *stock* de 50% (m/m) PEG 3350 e 25% (m/m) dextrano 500 kDa. A concentração de PEG e dextrano no sistema foi de 7% e 5% (m/m), respetivamente, tendo sido estudadas três concentrações de cada LI, nomeadamente 1%, 5% e 10% (m/m), exceto para o LI [Ch][Ac] em que se estudaram ainda as concentrações de 7,5% e 15% (m/m). O sobrenadante celular representou 30% de massa do sistema em todos os sistemas em que o LI foi adicionado como adjuvante. Foram ainda preparados brancos, em que não foi adicionada qualquer quantidade de sobrenadante. Finalmente, adicionou-se água de modo a atingir a composição final desejada para os sistemas. Todas as misturas foram preparadas gravimetricamente, com um erro associado de $\pm 10^{-6}$ g, e vigorosamente agitadas com auxílio de um vórtex (Ika). De forma a ser atingido o equilíbrio e garantindo a completa separação das fases, os sistemas foram centrifugados a 3500 rpm durante um período de 30 minutos (período de tempo estabelecido em trabalhos de otimização prévios), numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf), permitindo o particionamento completo da IgG e das restantes impurezas proteicas entre as duas fases coexistentes.

Em todas as misturas consideradas para este tipo de sistema e com as composições utilizadas, a fase aquosa rica em PEG é a fase superior, enquanto que a fase aquosa enriquecida em dextrano corresponde à fase inferior.

Posteriormente, os volumes foram determinados e as fases devidamente separadas, utilizando uma micropipeta para a remoção da fase superior e uma seringa de 2 mL para a obtenção da fase inferior. Ambas as fases foram posteriormente analisadas, tendo sido quantificada a IgG e as proteínas totais presentes em cada fase, permitindo determinar o coeficiente de partição, o rendimento e eficiência de extração da IgG. Prepararam-se pelo menos 2 réplicas correspondentes a cada SAB estudado.

2.2.4.2. Determinação do pH das fases

O pH de ambas as fases foi determinado a 25 °C (± 1 °C) utilizando um medidor Metrohm 702 SM Titrino (Herisau, Suíça), com uma incerteza de $\pm 0,01$.

2.2.4.3. Quantificação de IgG

A IgG presente em cada fase foi quantificada através de cromatografia de afinidade num sistema ÄKTA™ 10 Purifier da GE Healthcare (Uppsala, Suécia) utilizando uma coluna de afinidade analítica POROS Proteína G (2,1 × 30 mm) da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). A adsorção da IgG à coluna foi realizada com um tampão fosfato a pH 7,4 contendo 50 mM de fosfato de sódio (NaH_2PO_4) e 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) durante 1,8 minutos. De seguida, a eluição do anticorpo foi conseguida através da diminuição do valor de pH, utilizando um tampão a pH 2 contendo 12 mM de ácido clorídrico (HCl) e 150 mM de NaCl durante um período de 2,5 minutos. Finalmente, a coluna foi reequilibrada com o tampão de adsorção durante 3,4 minutos. As amostras das fases superiores e inferiores contendo IgG foram diluídas 20 vezes no tampão de adsorção e foram injetados 0,5 mL na coluna, recorrendo ao sistema Autosampler A-900 da GE Healthcare. A concentração de IgG foi determinada a partir de uma curva de calibração preparada antes de cada ensaio de quantificação, e obtida utilizando IgG Gammanorm como biomolécula-padrão. A quantificação foi realizada a 215 nm. Os padrões de IgG foram preparados numa gama de concentrações compreendidas entre 0,2 e 20 mg/L, tal como é possível observar na Figura A.1 do Anexo A, que representa o exemplo de uma curva de calibração obtida utilizando este

procedimento. No final de cada ensaio, a coluna foi armazenada em tampão fosfato a pH 7,4, contendo 10 mM de NaH₂PO₄ e 0,002% de azida de sódio.

2.2.4.4. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG

Os coeficientes de partição da proteína alvo (IgG), K_{IgG} , foram determinados de acordo com a Equação 8,

$$K_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG}}{[IgG]_{dextrano}} \quad (8)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{dextrano}$ representam a concentração da IgG na fase aquosa rica em PEG e em dextrano, respetivamente.

O rendimento de extração de IgG para a fase rica em PEG foi determinado através da Equação 9,

$$\%Y_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{inicial} \times V_{inicial}} \times 100 \quad (9)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ representa a concentração de IgG na fase aquosa rica em PEG, $[IgG]_{inicial}$ representa a concentração de IgG adicionada inicialmente a partir do *stock* para a formação do sistema, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{inicial}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e o volume da solução *stock* adicionada ao sistema, respetivamente. A eficiência de extração foi determinada através da Equação 10:

$$\%EE_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG} + [IgG]_{dextrano} \times V_{dextrano}} \times 100 \quad (10)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{dextrano}$ representam a concentração de proteína na fase aquosa rica em PEG e dextrano, respetivamente, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{dextrano}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e em dextrano, respetivamente. Foram investigadas possíveis interferências do PEG 3350, do dextrano 500 kDa e dos vários LIs sob o método analítico utilizado, não se tendo verificado interferências dos cosntituíntes dos sistemas.

2.2.4.6. Determinação do grau de pureza da IgG

Uma vez que os sobrenadantes das culturas celulares CHO se tratam de uma matriz real complexa, contendo outras proteínas para além da IgG, torna-se relevante calcular o grau de pureza e da IgG na fase rica em PEG e na fase rica em dextrano após a etapa de SAB. Para isso são necessários os dados da quantificação da IgG por cromatografia de afinidade obtidos no capítulo 2.2.3.3. desta dissertação, tornando-se também necessário quantificar as proteínas totais presentes em cada fase (que inclui a IgG + impurezas proteicas). A concentração das proteínas solúveis totais presentes em ambas

as fases coexistentes foi determinada pelo método de Bradford (102), utilizando o *kit* Coomassie Plus da Pierce. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços, nas quais 200 µL do reagente de Coomassie foram adicionados a cada 50 µL das amostras, brancos e soluções padrão. De seguida, a placa foi agitada num agitador de microplacas durante um período de 30 segundos e incubada durante um período de 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, determinaram-se as absorvâncias a um comprimento de onda de 595 nm num leitor de microplacas SPECTROstar® Nano da BMG Labtech. De modo a evitar interferências do PEG, dextrano e LI no método, todas as amostras das fases superior e inferior foram analisadas contra sistemas controlo, contendo a mesma composição das fases mas sem a presença de proteínas. A concentração das proteínas totais foi posteriormente determinada a partir de uma curva de calibração obtida utilizando BSA. Os padrões de BSA preparados variaram numa gama de concentrações compreendidas entre 5 e 400 mg/L, tal como é possível observar na Figura B.1 do Anexo B, que representa o exemplo de uma curva de calibração obtida utilizando este procedimento.

O grau de pureza da IgG em cada fase do sistema, $\%Pureza_{IgG}$, foi determinado recorrendo à Equação 11,

$$\%Pureza_{IgG} = \frac{[IgG]}{[Proteínas]} \quad (11)$$

em que $[IgG]$ e $[Proteínas]$ representam as concentrações de IgG e das proteínas totais na fase, respetivamente.

2.2.5. Avaliação do perfil proteico

Para avaliar e confirmar a extração seletiva da IgG face às restantes impurezas proteicas dos sobrenadantes das culturas celulares, bem como a integridade e manutenção do peso molecular da proteína, após cada etapa de quantificação, foi investigado o perfil proteico das fases aquosas coexistentes. Os perfis de distribuição proteica em ambas as fases dos sistemas em estudo foram investigados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram preparadas e diluídas em tampão de carregamento contendo 62,5 mM Tris-HCl pH 6,2, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol e 10% glicerol, e desnaturadas em condições redutoras através da adição de 0,1 M DTT e de uma etapa de aquecimento da amostra a 100°C durante um período de 5 minutos. Para um volume final de 50 µL, foram adicionados 25 µL de tampão de carregamento, 5

μL de DTT e 20 μL de amostra da fase. Um volume de 20 μL de cada amostra diluída foi carregado num gel de poliacrilamida (stacking gel: 12% T, 3,3% C; gel resolvente: 4% T, 3,3% C), preparado a partir de uma solução *stock* contendo 40% acrilamida/bisacrilamida (29:1 com um tampão de corrida cuja composição inclui 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS a pH 8,3. Utilizou-se um padrão de pesos moleculares de proteínas para o SDS-PAGE, *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-rad). Os géis foram corados com um procedimento habitual de coloração, em solução aquosa contendo azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% (m/v), etanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água, num agitador orbital e a uma velocidade moderada, durante o tempo necessário a uma temperatura de 40°C. Os géis foram descorados através da sua lavagem numa solução contendo ácido acético a 10% (v/v), etanol a 30 % (v/v) e água, num agitador orbital a uma velocidade moderada, até ao desaparecimento da cor de fundo do gel e à temperatura ambiente. Posteriormente, os géis foram armazenados em água milli-Q À temperatura ambiente. Finalmente, as imagens digitais dos géis foram adquiridas através de um densitómetro calibrado GS-800 (Bio-rad) e todos os géis foram analisados utilizando a ferramenta de análise Quantity One 4.6 (Bio-rad).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos SAB constituídos por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LIs

Os SAB em estudo neste trabalho são constituídos por dois polímeros diferentes, PEG e dextrano, sendo dois dos polímeros mais utilizados em processos de separação de biomoléculas (26). De modo a aumentar a eficiência de extração e selectividade destes sistemas para a IgG, foi efetuado um estudo alargado de vários LIs de diferentes famílias como adjuvantes em SAB.

Procedeu-se inicialmente à obtenção do diagrama de fases do sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O, seguindo uma estratégia já descrita na literatura (26). O diagrama de fases deste sistema ternário encontra-se representado na Figura 6. O diagrama de fases é apresentado em fração mássica, para ser mais simples avaliar a quantidade de cada polímero necessária para a formação sistemas do tipo líquido-líquido com vista à sua aplicação em processos biotecnológicos. Neste sistema, a fase de topo corresponde à fase aquosa rica em PEG, enquanto que a fase inferior é constituída maioritariamente por dextrano e água. Os dados experimentais da curva binodal foram ajustados pela Equação 2, e os parâmetros da regressão foram estimados pelo método da regressão dos mínimos quadrados. Os valores obtidos e desvios-padrão (σ) correspondentes encontram-se apresentados na Tabela 4.

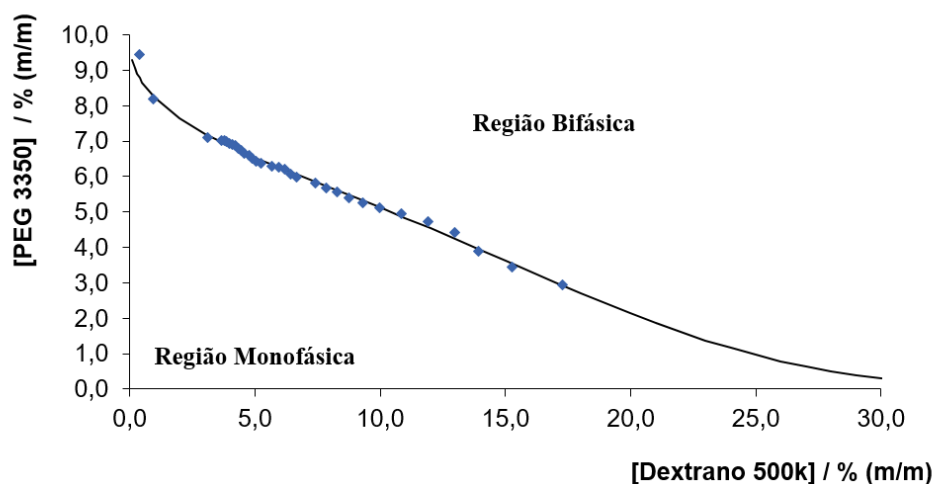


Figura 6 - Diagrama de fases do sistema ternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (◆); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (—).

Tabela 4 - Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação 2.

	$A \pm \sigma$	$B \pm \sigma$	$C \pm \sigma (x 10^{-5})$	R^2
Sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O	$9,81 \pm 0,14$	$-0,177 \pm 0,007$	$9,21 \pm 0,651$	0,995

Os dados das *tie-lines* experimentais (TLs) e os respetivos comprimentos de *tie-line* (TLLs) encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados experimentais das TLs e TLLs para o sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O.

Sistema	Composição em fração mássica (m/m) $\times 100$						TLL
	[dextrano] superior	[PEG] superior	[dextrano] M	[PEG] M	[dextrano] inferior	[PEG] inferior	
PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O	0,388	8,79	5,20	7,16	20,1	2,11	20,8
	0,133	9,20	5,78	7,10	21,0	1,86	16,5

Seguidamente procedeu-se à determinação do diagrama de fases dos sistemas constituídos por LIs como adjuvantes no sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + LI + H₂O, a 25 °C (± 1 °C) e à pressão atmosférica. De uma forma geral, verificou-se que os SAB constituídos por LIs como adjuvantes exibem uma maior capacidade para a separação das fases do que o sistema original polímero-polímero. Esta tendência sugere

que os LIs alteram a polaridade de uma das fases, melhorando assim a performance destes sistemas. Desta forma, destacam-se duas vantagens associadas a este tipo de SAB usando LIs como adjuvantes: melhor desempenho para a separação de fases, exigindo portanto quantidades mais baixas de cada soluto para formar um SAB, e são sistemas mais benignos e menos dispendiosos do que os SAB do tipo LI-polímero, pois são utilizadas quantidades inferiores de LI (95).

Os diagramas de fases são apresentados e discutidos de seguida em várias figuras de modo a individualizar os efeitos de cada família e tipo de LIs estudados. Na Figura 7 é possível observar os diagramas de fase dos sistemas constituídos por $[N_{1111}]\text{Cl}$ e $[N_{4444}]\text{Cl}$, em que ambos os LIs têm o mesmo anião.

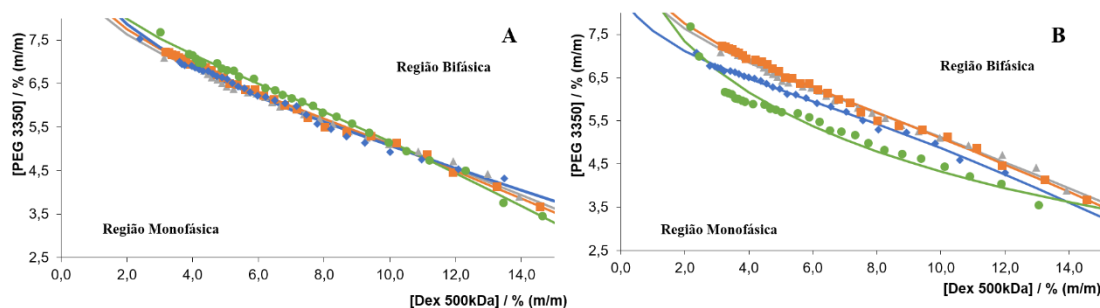


Figura 7 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O + LI, a 25 °C ($\pm 1\text{ °C}$), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \triangle); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \triangle); em que A - $[N_{1111}]\text{Cl}$ e B - $[N_{4444}]\text{Cl}$.

No diagrama do LI com o catião $[N_{1111}]^+$ não se notam diferenças muito relevantes na capacidade de promover a formação de SAB com o aumento da concentração do LI, pelo que nenhuma tendência pode ser sugerida. Apenas se verifica que a concentração de 10% deste LI parece dificultar ligeiramente a formação de sistemas de duas fases líquidas, uma vez que a curva binodal encontra-se ligeiramente acima das restantes. No que diz respeito ao catião $[N_{4444}]^+$, já é possível verificar algum impacto na formação do SAB, seguindo a seguinte tendência: controlo $\approx 1\%$ $[N_{4444}]\text{Cl} < 5\%$ $[N_{4444}]\text{Cl} < 10\%$ $[N_{4444}]\text{Cl}$. Neste caso, a presença de LI promove a separação das fases do sistema uma vez que a região bifásica dos sistemas contendo IL é maior do que a do controlo (sem LI adicionado). As diferenças observadas entre o $[N_{1111}]\text{Cl}$ e o $[N_{4444}]\text{Cl}$ podem ser devidas ao aumento da cadeia alquílica do catião do LI, resultando na facilitação de formação do sistema com $[N_{4444}]\text{Cl}$ por ser um LI mais hidrofóbico.

Os diagramas de fase correspondentes aos sistemas com LIs da família dos fosfónios encontram-se representados na Figura 8. Para os LIs $[P_{4444}]\text{Cl}$ e $[P_{444(14)}]\text{Cl}$, a

adição de pequenas quantidades de LI promove a formação de SAB, sendo esta tanto maior quanto maior a concentração de LI. Uma vez mais verifica-se uma dependência acentuada com a hidrofobicidade do catião do LI, uma vez que os diagramas com o LI $[P_{444(14)}]Cl$ apresentam maiores regiões bifásicas comparativamente com o $[P_{4444}]Cl$.

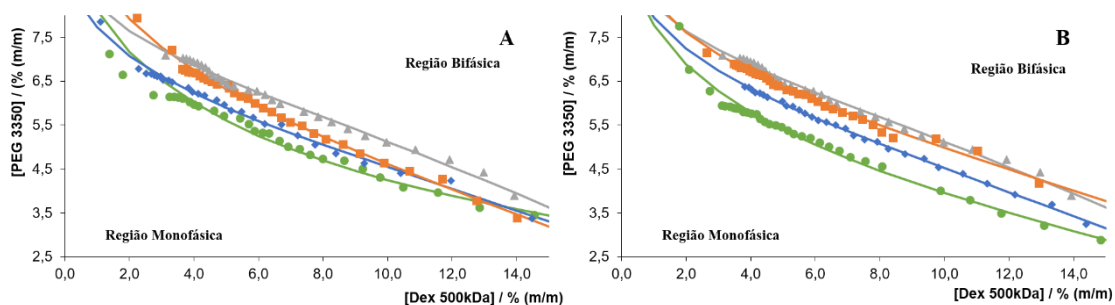


Figura 8 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \triangle); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \triangle); onde A - $[P_{4444}]Cl$ e B - $[P_{444(14)}]Cl$.

Na Figura 9 apresentam-se os diagramas dos sistemas constituídos pelos LIs derivados do imidazólio, nomeadamente o $[C_4mim][HSO_4]$, $[C_4mim]Br$ e $[C_4mim]Cl$, respetivamente. É possível verificar que os LIs com os aniões Br^- e Cl^- não apresentam diferenças significativas na formação de SAB. No que respeita à presença do anião $[HSO_4]^-$, verifica-se que apenas quando utilizadas maiores concentrações deste LI (10%) o seu efeito é mais notório na facilitação da formação de SAB. Relativamente ao $[C_4mpy]Cl$, um LI que pertence à família dos piridínios, também apresentado na Figura 9, também não se verificaram diferenças significativas para a formação de SAB. Em suma, quando se comparam as diferentes famílias de LIs, conclui-se que aqueles cujo efeito é mais notório em termos de alteração dos diagramas de fase ocorre com o $[N_{4444}]Cl$, o $[P_{444(14)}]Cl$ e o $[C_4mim][HSO_4]$.

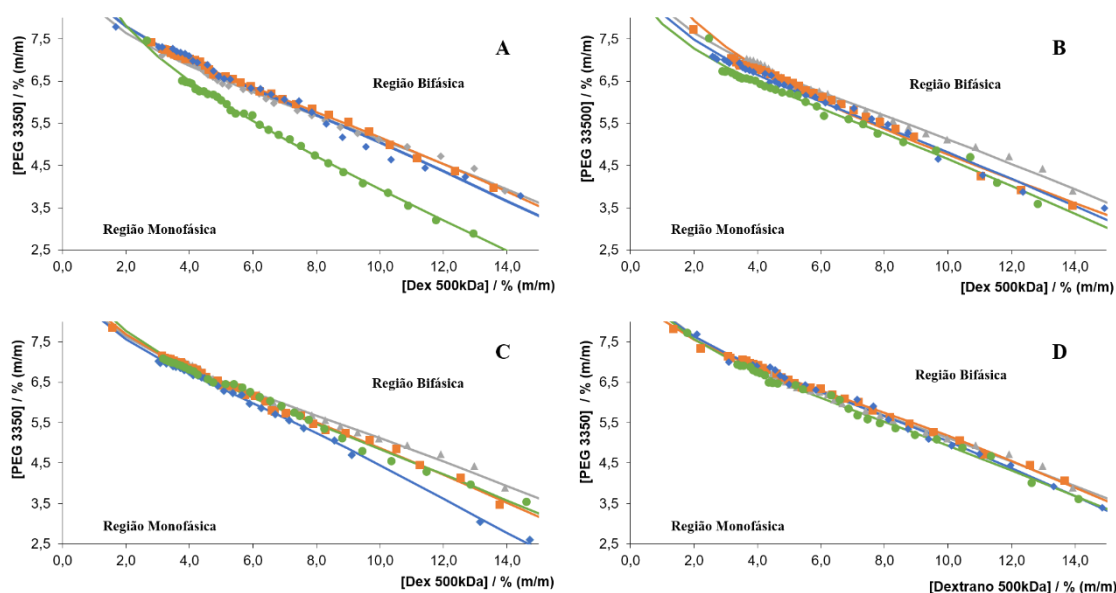


Figura 9 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \blacktriangle); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 10% de LI - \bullet , e controlo \blacktriangle); em que A - [C₄mim][HSO₄], B - [C₄mim]Br, C - [C₄mim]Cl e D - [C₄mpy]Cl.

Para a família das colinas, cujos diagramas se encontram representados na Figura 10, foram estudados os seguintes LIs: [Ch][NTf₂], [Ch][Bit], [Ch][DHP], [Ch]Cl, [Ch][Ac] e [Ch][But]. Os LIs derivados do catião colínio combinados com os aniões Cl⁻, [DHP]⁻ e [Bit]⁻ não aparentam ter um efeito preponderante na facilitação da formação de SAB. Por outro lado, o anião [NTf₂]⁻ é o único que promove a formação de SAB quando em concentrações mais elevadas, nomeadamente 5% ou 10% de LI. Surpreendentemente, os LIs com os aniões [Ac]⁻ e [But]⁻ aparentam dificultar a formação de SAB à medida que se aumenta a concentração de LI no sistema, uma vez que as curvas binodais às diferentes concentrações encontram-se acima da curva binodal do controlo, possivelmente devido a fenómenos de saturação e partição do próprio LI. Por outro lado, a [Ch][NTf₂] está entre os ILs com maior capacidade de promover a formação de SAB.

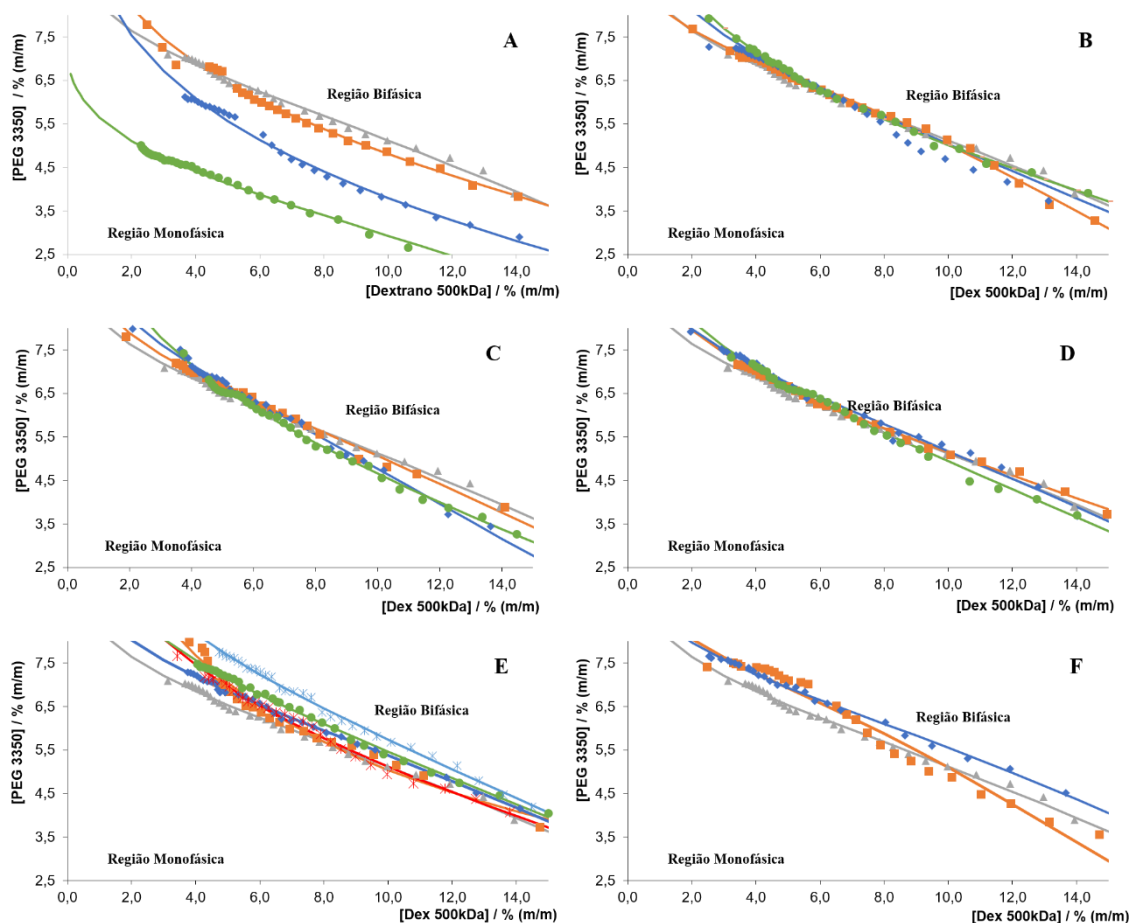


Figura 10 - Diagrama de fases do sistema quaternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 7,5% de LI - \times , 10% de LI - \bullet , 15% de LI - \times , e controlo \triangle); ajuste da curva binodal pela Equação 2 (1% de LI - \square , 5% de LI - \diamond , 7,5% de LI - \times , 10% de LI - \bullet , 15% de LI - \times , e controlo \triangle); onde A - [Ch][NTf₂], B - [Ch][Bit], C - [Ch][DHP], D - [Ch]Cl, E - [Ch][Ac] e F - [Ch][But].

Em suma, e de uma forma geral a adição de LIs como adjuvantes aos sistemas tradicionais formados por dois polímeros facilita a formação de SAB, uma vez que a região bifásica de alguns destes sistemas é superior comparativamente com o sistema controlo (sem adição de LI). Em suma, este efeito é mais notório quando utilizando os LIs [N₄₄₄₄]Cl, [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl, [C_{4mim}][HSO₄] e [Ch][NTf₂].

Os dados experimentais de todas as curvas binodais apresentadas anteriormente foram ajustados pela Equação 2. Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados, e os seus valores e correspondentes desvios-padrão (σ) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação 2.

Sistema com LI	A $\pm \sigma$	B $\pm \sigma$	C $\pm \sigma$ ($\times 10^{-5}$)	R ²
1% [N1111]Cl	10,1 \pm 0,1	-0,183 \pm 0,007	9,96 \pm 0,70	0,995
5% [N1111]Cl	10,7 \pm 0,2	-0,281 \pm 0,010	5,72 \pm 0,85	0,992
10% [N1111]Cl	10,2 \pm 0,2	-0,172 \pm 0,010	13,6 \pm 0,8	0,996
1% [N4444]Cl	10,1 \pm 0,1	-0,183 \pm 0,006	9,97 \pm 0,70	0,995
5% [N4444]Cl	8,80 \pm 0,12	-0,149 \pm 0,007	12,2 \pm 1,1	0,995
10% [N4444]Cl	11,2 \pm 0,2	-0,301 \pm 0,027	0,228 \pm 2,99	0,940
1% [P4444]Cl	11,5 \pm 0,2	-0,265 \pm 0,0098	7,65 \pm 1,03	0,994
5% [P4444]Cl	9,56 \pm 0,15	-0,213 \pm 0,008	7,09 \pm 1,04	0,992
10% [P4444]Cl	10,9 \pm 0,5	-0,300 \pm 0,024	-0,127 \pm 3,46	0,926
1% [P444(14)]Cl	10,3 \pm 0,1	-0,211 \pm 0,007	5,49 \pm 1,03	0,991
5% [P444(14)]Cl	9,12 \pm 0,06	-0,221 \pm 0,003	8,54 \pm 0,35	0,999
10% [P444(14)]Cl	10,4 \pm 0,4	-0,290 \pm 0,018	4,69 \pm 2,01	0,974
1% [C4mim][HSO ₄]	9,99 \pm 0,09	-0,175 \pm 0,004	10,6 \pm 0,5	0,998
5% [C4mim][HSO ₄]	10,0 \pm 0,2	-0,178 \pm 0,010	12,5 \pm 1,3	0,986
10% [C4mim][HSO ₄]	11,9 \pm 0,3	-0,298 \pm 0,011	16,4 \pm 1,1	0,997
1% [C4mim]Br	11,3 \pm 0,2	-0,249 \pm 0,009	7,47 \pm 0,85	0,989
5% [C4mim]Br	9,76 \pm 0,17	-0,188 \pm 0,009	11,3 \pm 1,2	0,988
10% [C4mim]Br	9,44 \pm 0,35	-0,184 \pm 0,019	12,5 \pm 2,3	0,979
1% [C4mim]Cl	10,1 \pm 0,2	-0,191 \pm 0,008	12,3 \pm 0,9	0,995
5% [C4mim]Cl	9,86 \pm 0,17	-0,186 \pm 0,008	20,9 \pm 0,9	0,998
10% [C4mim]Cl	10,5 \pm 0,2	-0,211 \pm 0,009	10,3 \pm 1,1	0,992
1% [C4mpy]Cl	9,39 \pm 0,09	-0,153 \pm 0,005	11,2 \pm 0,5	0,997
5% [C4mpy]Cl	9,68 \pm 0,24	-0,167 \pm 0,012	12,5 \pm 1,1	0,993
10% [C4mpy]Cl	9,82 \pm 0,19	-0,184 \pm 0,009	10,6 \pm 1,0	0,993
1% [Ch][NTf ₂]	12,2 \pm 0,3	-0,283 \pm 0,013	3,40 \pm 1,40	0,988
5% [Ch][NTf ₂]	12,6 \pm 0,5	-0,363 \pm 0,020	5,29 \pm 1,96	0,991
10% [Ch][NTf ₂]	7,17 \pm 0,14	-0,240 \pm 0,010	13,7 \pm 1,4	0,992
1% [Ch][Bit]	9,50 \pm 0,16	-0,152 \pm 0,008	15,8 \pm 0,8	0,996
5% [Ch][Bit]	11,1 \pm 0,2	-0,222 \pm 0,010	8,9 \pm 1,0	0,993
10% [Ch][Bit]	12,2 \pm 0,2	-0,227 \pm 0,007	4,55 \pm 0,67	0,998
1% [Ch][DHP]	10,4 \pm 0,2	-0,194 \pm 0,008	10,6 \pm 1,0	0,993
5% [Ch][DHP]	11,2 \pm 0,3	-0,218 \pm 0,011	16,4 \pm 1,3	0,994
10% [Ch][DHP]	13,2 \pm 0,3	-0,305 \pm 0,010	8,25 \pm 0,91	0,996
1% [Ch]Cl	10,8 \pm 0,2	-0,216 \pm 0,007	5,96 \pm 0,63	0,997
5% [Ch]Cl	10,5 \pm 0,2	-0,192 \pm 0,012	9,96 \pm 1,34	0,991
10% [Ch]Cl	11,4 \pm 0,2	-0,233 \pm 0,009	9,55 \pm 0,80	0,995
1% [Ch][Ac]	15,7 \pm 1,1	-0,359 \pm 0,032	0,069 \pm 2,71	0,969
5% [Ch][Ac]	10,4 \pm 0,1	-0,182 \pm 0,005	8,43 \pm 0,55	0,997
7.5% [Ch][Ac]	13,1 \pm 0,3	-0,282 \pm 0,011	5,09 \pm 0,94	0,9930
10% [Ch][Ac]	11,9 \pm 0,2	-0,223 \pm 0,007	6,98 \pm 0,61	0,997
15% [Ch][Ac]	13,4 \pm 0,4	-0,246 \pm 0,013	7,17 \pm 0,91	0,995
1% [Ch][But]	10,1 \pm 0,4	-0,158 \pm 0,022	18,2 \pm 2,6	0,967
5% [Ch][But]	9,99 \pm 0,12	-0,159 \pm 0,006	8,51 \pm 0,76	0,996

Os dados das *tie-lines* experimentais (TLs) e os respectivos comprimentos de *tie-line* (TLLs) encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, em que: FS – fase superior; FI – fase inferior; M – ponto de mistura.

Composição em termos e frações mássicas (m/m)							
% LI	[dextrano]	[PEG]	[dextrano]	[PEG]	[dextrano]	[PEG]	TLL
	FS	FS	M	M	FI	FI	
1% [N₁₁₁₁]Cl	0,4444	8,8961	5,0644	7,2285	17,4484	2,7585	18,0777
	0,1254	9,4193	5,7504	7,2348	16,1200	3,1779	17,1692
5% [N₁₁₁₁]Cl	1,7180	8,0466	5,0092	6,9502	12,7623	4,3675	11,6410
	0,0414	10,2431	8,0728	7,0830	18,9845	2,8250	20,2600
10% [N₁₁₁₁]Cl	6,8670	6,4966	5,2297	7,0431	1,3985	8,3219	5,7651
	13,7590	5,3709	7,9827	7,0115	0,3817	9,1703	13,9064
1% [N₄₄₄₄]Cl	1,5294	8,0122	5,0842	6,8247	13,3472	4,0644	12,4598
	0,2812	9,1205	5,7455	7,0624	15,7520	3,2935	16,5318
5% [N₄₄₄₄]Cl	0,0035	8,7216	5,0586	6,9359	19,2537	1,9214	20,4160
	-	-	-	-	-	-	-
10% [N₄₄₄₄]Cl	1,0554	8,2538	5,1563	7,0576	19,2172	2,9560	18,9188
	0,6031	8,9011	5,7576	7,1221	19,1292	3,1974	17,4827
1% [P₄₄₄₄]Cl	1,4117	8,4099	5,1371	6,9688	14,6741	3,2796	14,2201
	0,1902	10,2607	7,9819	7,1547	22,4204	1,3880	23,9377
5% [P₄₄₄₄]Cl	0,2055	8,6818	5,0211	7,0485	18,8418	2,3609	19,6791
	0,0028	9,4538	5,7885	7,2277	17,7721	2,6169	19,0392
10% [P₄₄₄₄]Cl	0,7238	8,4783	5,1338	7,0901	17,7574	3,1164	17,8576
	0,4319	8,9847	5,7150	7,2123	18,0012	3,0905	18,5316
1% [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl	0,7050	8,5933	5,0030	7,2224	18,4140	2,9446	18,5881
	0,0300	9,8908	7,0366	7,1594	16,9541	3,2931	18,1646
5% [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl	0,3752	8,6554	4,9912	7,0479	19,6486	1,9436	20,4085
	-	-	-	-	-	-	-
10% [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl	0,4007	8,6383	5,0152	7,0409	19,4530	2,0428	20,1616
	0,0344	9,8373	6,9387	7,2405	21,8215	1,6430	23,2772
1% [C_{4mim}][HSO₄]	0,7750	8,5588	4,9805	7,0793	15,2966	3,4500	15,3941
	-	-	-	-	-	-	-
5% [C_{4mim}][HSO₄]	0,5525	8,7882	5,0319	7,0978	16,1440	2,9043	16,6647
	-	-	-	-	-	-	-
10% [C_{4mim}][HSO₄]	0,8716	9,0260	4,9885	7,0291	15,0630	2,1426	15,7727
	0,2771	10,1914	8,0010	7,0398	24,6890	0,2305	26,3658
1% [C_{4mim}]Br	1,1830	8,5956	5,1158	7,0727	14,1711	3,5663	13,9278
	0,1087	10,3846	8,0386	7,0711	20,2149	1,9832	21,7908
5% [C_{4mim}]Br	0,3008	8,8047	5,0874	7,0010	17,3410	2,4759	18,1774
	0,0367	9,4162	5,8011	7,0889	16,8473	2,6291	18,1290
10% [C_{4mim}]Br	0,0204	9,1962	5,0042	7,2001	17,0765	2,3649	18,3733
	-	-	-	-	-	-	-
1% [C_{4mim}]Cl	0,3657	8,9860	4,999	7,1684	16,3788	2,7055	17,2006
	-	-	-	-	-	-	-

Continuação da tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, em que: FS – fase superior; FI – fase inferior; M – ponto de mistura.

5% [C₄mim]Cl	0,0578	9,4301	5,3779	6,9751	16,7404	1,7317	18,3732
	-	-	-	-	-	-	-
10% [C₄mim]Cl	7,2111	5,7200	5,1383	6,9495	0,0610	9,9611	8,3132
	-	-	-	-	-	-	-
1% [C₄mpy]Cl	0,4111	8,5116	5,0242	6,9558	19,1712	2,1846	19,7984
	-	-	-	-	-	-	-
5% [C₄mpy]Cl	0,0929	9,1966	5,0672	7,2967	18,8850	2,0191	20,1162
	-	-	-	-	-	-	-
10% [C₄mpy]Cl	0,3325	8,8297	5,1261	7,1887	22,6077	1,2041	23,5442
	-	-	-	-	-	-	-
1% [Ch][NTf₂]	1,9760	8,1796	5,0320	7,0673	13,7072	3,9098	12,4841
	0,4257	10,1287	7,9764	7,1665	19,1805	2,7711	20,1464
5% [Ch][NTf₂]	1,1982	8,4580	4,9707	6,9481	16,7677	2,2265	16,7702
	0,2093	10,6510	7,9883	7,1618	20,5041	1,5480	22,2429
10% [Ch][NTf₂]	2,8876	4,7573	4,5714	4,3165	8,8671	3,1919	6,1810
	7,0609	3,6142	5,0325	4,2067	2,0894	5,0664	5,1792
1% [Ch][Bit]	3,6514	7,3145	5,0221	7,0426	7,9207	5,8460	4,5147
	-	-	-	-	-	-	-
5% [Ch] [Bit]	1,3649	8,5686	5,0438	7,1794	14,1835	3,7281	13,7281
	0,0706	10,4694	8,0456	6,9777	18,3577	2,4628	19,9631
10% [Ch] [Bit]	0,2210	9,0295	5,0896	7,0255	14,1911	3,2792	15,1072
	12,8111	4,2659	7,0045	7,0853	0,4224	10,2856	13,7737
1% [Ch] [DHP]	6,9913	5,9973	5,0064	7,0469	0,1657	9,6060	7,7211
	0,0255	10,0797	7,0082	7,0408	16,3097	2,9927	17,7595
5% [Ch] [DHP]	7,0085	5,9393	5,0438	7,1794	0,1628	10,2602	12,9480
	13,0611	3,5275	7,0082	6,8456	0,0525	10,6587	14,8351
10% [Ch] [DHP]	7,0345	5,7316	5,0378	7,0523	1,0509	9,6894	7,1741
	14,8002	3,1356	7,9710	7,1413	0,1610	11,7223	16,9717
1% [Ch]Cl	6,5185	6,1254	5,0755	6,9900	0,1475	9,9411	7,4260
	9,0837	5,3924	5,8059	7,1181	0,0886	10,1281	10,1655
5% [Ch]Cl	7,0041	6,0943	5,0455	7,0455	0,3581	9,3370	7,3949
	8,8941	5,5133	5,7366	7,0950	0,0767	9,9302	9,8618
10% [Ch]Cl	1,8614	8,2582	4,9698	7,0734	13,6401	3,7687	12,6052
	0,1835	10,2770	8,0399	6,9824	20,6269	1,7040	22,1682
1% [Ch][Ac]	2,0728	9,3748	6,0204	7,5997	13,6800	4,1554	12,7267
	1,0186	10,9434	9,0245	7,4863	18,6955	3,3102	19,2546
5% [Ch] [Ac]	0,0596	9,9381	6,0368	7,5405	15,9185	3,5767	17,0872
	-	-	-	-	-	-	-
7.5% [Ch] [Ac]	0,9283	10,0168	6,0140	7,6451	13,7032	4,0593	14,0957
	0,1365	11,8441	9,0357	7,5047	18,7385	2,7734	20,6958
10% [Ch] [Ac]	9,9649	5,4762	5,9655	7,5405	0,2717	10,5727	10,9513
	12,713	4,6397	7,0753	7,6510	0,0321	11,4127	14,3767

Continuação da tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI, em que: FS – fase superior; FI – fase inferior; M – ponto de mistura.

15% [Ch] [Ac]	2,6947	8,9547	6,1099	7,4492	9,9565	5,7536	7,9360
	0,0905	12,4777	8,9484	7,7768	17,3810	3,3017	19,5745

Foi possível caracterizar vários SAB PEG/dextrano utilizando vários LIs como adjuvantes, em diferentes concentrações, e avaliar o seu impacto em termos dos seus diagramas de fases, TLs e TLLs. No capítulo seguinte desta dissertação, é avaliado o potencial destes sistemas enquanto plataformas extrativas e de purificação de mAbs diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO.

3.2. Extração e purificação de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO

Após a etapa de caracterização dos SAB, procedeu-se à avaliação da sua potencialidade como plataformas de extração e purificação de anticorpos monoclonais IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12. A estratégia nesta etapa do trabalho passou por testar vários LIs como adjuvantes do SAB PEG/Dextrano, em diferentes concentrações, nomeadamente 1, 5 e 10 (m/m)% para todos os LI anteriormente descritos, sendo que para o [Ch][Ac] também se estudaram as concentrações de 7,5 e 15 (m/m)%. Os pontos de mistura estudados encontram-se sumariados na Tabela 6.

Tendo em consideração os resultados obtidos, nem todos os SAB se demonstraram adequados como sistemas de extração líquido-líquido para IgG. De facto, com alguns LIs derivados do catião colínio ([Ch][NTf₂], [Ch][DHP] e [Ch][Bit]) observou-se a precipitação acentuada de proteínas, indicando portanto que ocorreu a saturação das fases e/ou que estes LIs conduzem à desnaturação das proteínas na matriz real, incluindo o IgG.

Tabela 8 - Condições testadas para a extração seletiva e purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 com o sistema ternário controle PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI.

LI	[PEG] (m/m)%	[dextrano] (m/m)%	[IgG] (m/m)%	[LI] (m/m)%	[H ₂ O] (m/m)%
Sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + sobrenadante contendo IgG anti-IL-8					
-	7,0	5,0	30,0	-	58,0
Sistema quaternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + LI + sobrenadante contendo IgG anti-IL-8					
[N ₁₁₁₁]Cl, [N ₄₄₄₄]Cl, [P ₄₄₄₄]Cl, [P ₄₄₄₍₁₄₎]Cl, [C _{4mim}]Br, [C _{4mim}]Cl, [C _{4mim}][HSO ₄], [C _{4mpy}]Cl, [Ch]Cl, [Ch][NTf ₂], [Ch][Bit], [Ch][DHP]	7,0	5,0	30,0	1,0	57,0
				5,0	53,0
				10,0	48,0
[Ch][Ac]	7,5	6,0	30,0	1,0	55,5
				5,0	51,5
				7,5	49,0
				10,0	46,5
				15,0	41,5

Em todos os sistemas foi efectuada a separação das fases, procedendo-se posteriormente à quantificação do IgG e proteínas totais em cada fase. A eficiência dos SAB foi avaliada no que concerne à extração seletiva da IgG para a fase superior, rica em PEG, sendo que para tal foram determinados os coeficientes de partição, a eficiência de extração, os rendimentos e o nível de pureza de IgG nessa mesma fase. Os resultados obtidos em termos de rendimentos e grau de pureza de IgG encontram-se representados nas Figuras 11, 13 e 15, e os coeficientes de partição e as eficiências de extração encontram-se representados nas Figuras 12, 14 e 16.

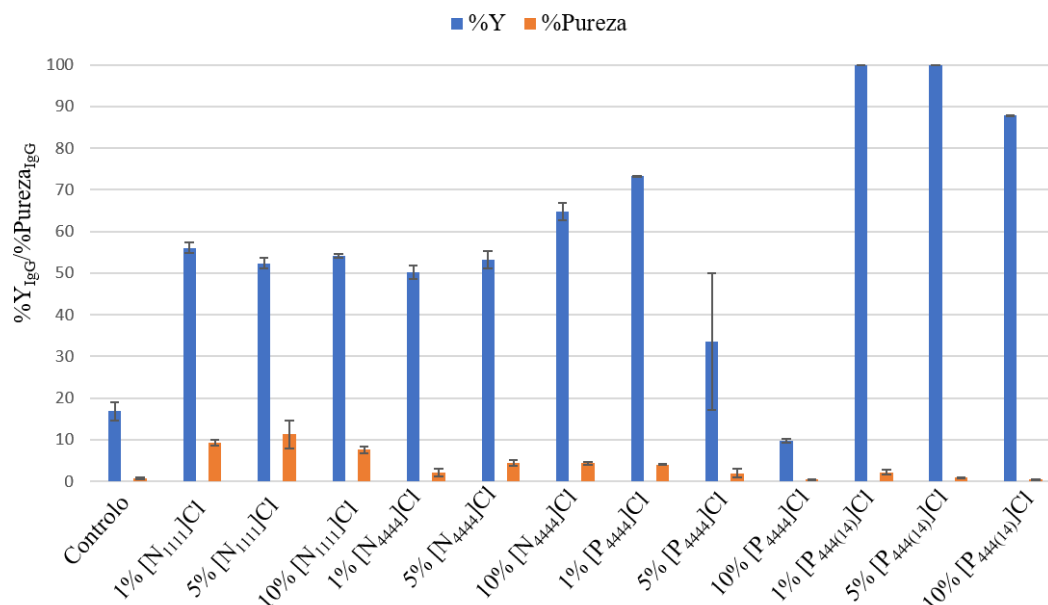


Figura 11 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

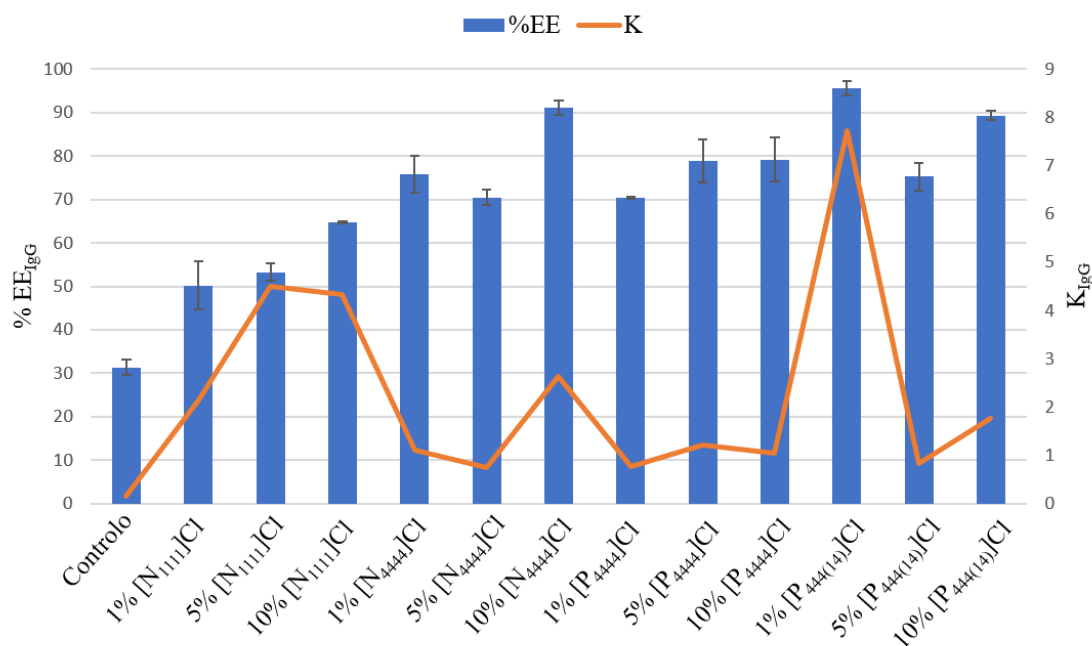


Figura 12 - Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

Relativamente aos rendimentos de extração dos sistemas constituídos pelos quatro LIs representados na Figura 11, verifica-se que a extração de IgG aumenta na seguinte ordem de concentrações: para o [N₁₁₁₁]Cl, 5% < 10% < 1 (m/m)%; para o [N₄₄₄₄]Cl, 1% < 5% < 10 (m/m)%; e para o [P₄₄₄₄]Cl, 10% < 5% < 1 (m/m)%. Para o [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl não foi possível obter uma correta quantificação do rendimento de extração dos anticorpos e

como tal esses resultados não serão discutidos, requerendo novos ensaios experimentais para confirmar os resultados obtidos. Os rendimentos de extração encontram-se compreendidos entre 9,7% e 100%, com purezas de IgG a variarem entre 0,5% e 11,2%, sendo que para o sistema controlo (sem LI adicionado) se obteve um rendimento de extração de 16,8% e um grau de pureza de 0,78%. Relativamente à eficiência de extração, foram observados valores próximos dos obtidos para os rendimentos de extração. De um modo geral, com a utilização de LIs foi possível obter melhores resultados no que diz respeito à extração/purificação de mAbs quando comparando com o sistema controlo (sem LI adicionado).

Seguidamente, foram avaliados os sistemas constituídos por LIs derivados do catião colínio como adjuvantes no sistemas tradicional polímero-polímero estudado, sendo que os resultados obtidos se encontram representados na Figura 13.

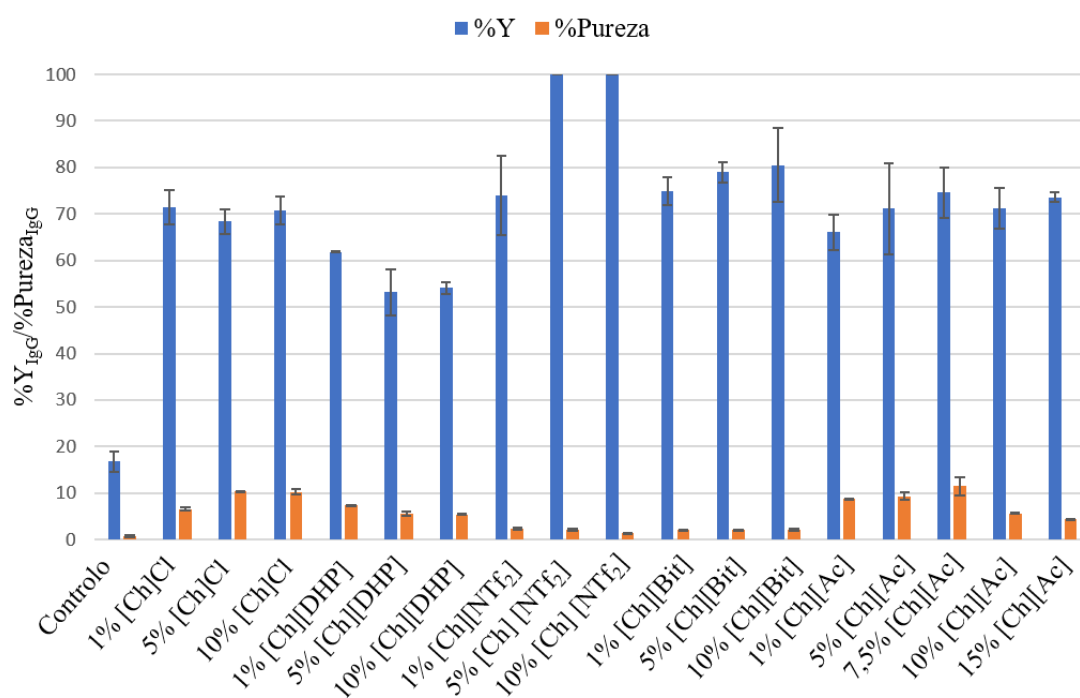


Figura 13 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

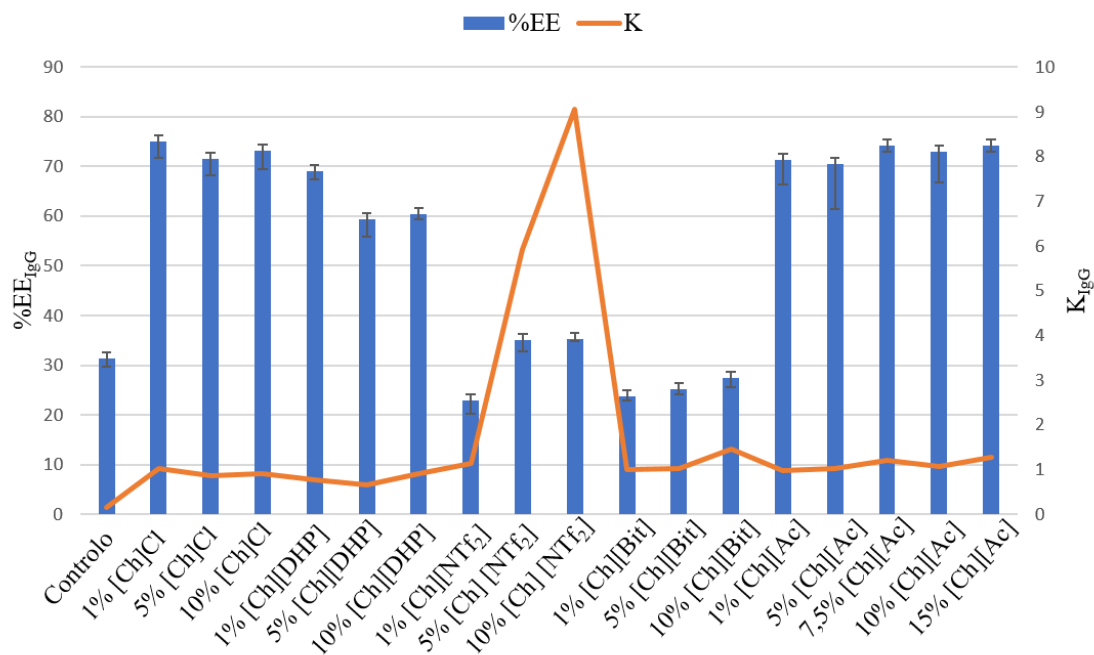


Figura 14 – Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

Relativamente aos rendimentos de extração dos sistemas em estudo, verifica-se que a extração de IgG aumenta na seguinte ordem para cada LI: para o [Ch]Cl, 5% < 10% ≈ 1 (m/m)%; para o [Ch]DHP, 5% < 10% < 1 (m/m)%; para o [Ch]NTf₂, 1% < 5% ≈ 10 (m/m)%; para o [Ch]Bit, 1% < 5% < 10 (m/m)%; e para o [Ch]Ac, 1% < 5% < 10% < 15% < 7,5 (m/m)%. Os rendimentos de extração obtidos com estes LIs encontram-se compreendidos entre 53,19% e 100%, com purezas de IgG a variarem entre 1,33% e 11,45%. Relativamente à eficiência de extração, foram observados valores próximos daqueles obtidos para os rendimentos de extração, excepto para dois LIs ([Ch]NTf₂) e [Ch]Bit) pois neste caso foi observada percepitação na interface do sistema. De uma forma geral, com a utilização destes LIs foi possível obter melhores resultados no que diz respeito à extração/purificação de IgG do que com o sistema PEG/Dextrano sem LI adicionado.

Por fim, foram avaliados os sistemas constituídos por LIs derivados do catião imidazólio e piridínio como adjuvantes nos sistemas tradicionais polímero-polímero. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 15 e 16.

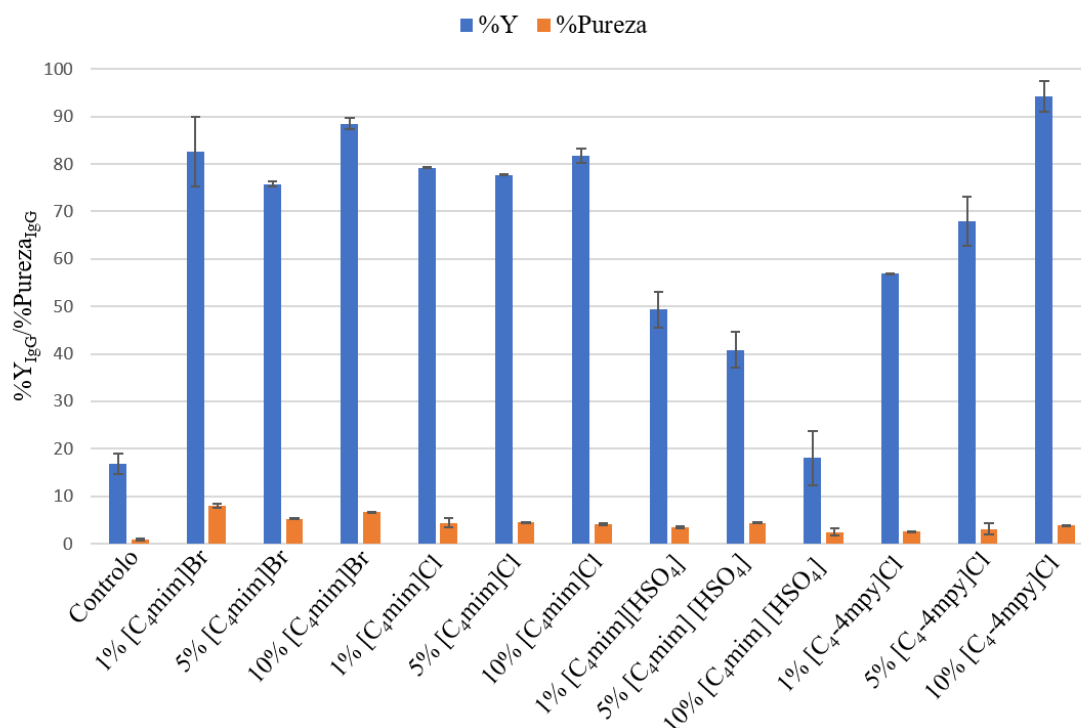


Figura 15 - Rendimentos de extração (%Y) e níveis de pureza (%Pureza) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

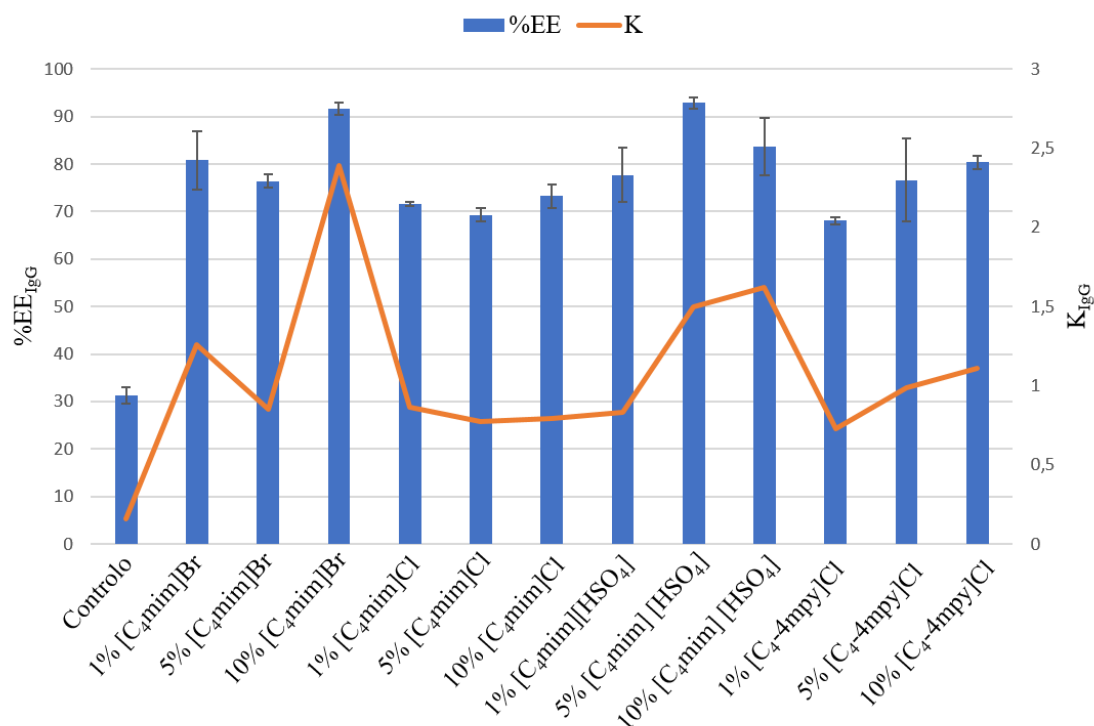


Figura 16 - Eficiência de extração da IgG (%EE) e coeficiente de partição de IgG (K) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 utilizando SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante.

Para os sistemas em estudo, verifica-se que a extração de IgG aumenta na seguinte ordem para cada LI: para o [C₄mim]Br, 5% < 1% < 10 (m/m)%; para o [C₄mim]Cl, 5% < 1% < 10 (m/m)%; para o [C₄mim][HSO₄], 10% < 5% < 1 (m/m)%; para o [C₄mpy]Cl, 1% < 5% < 10 (m/m)%. Os rendimentos de extração obtidos encontram-se compreendidos entre 40,83% e 94,22%, enquanto o grau de pureza de IgG varia entre 2,45% e 7,92%. Relativamente à eficiência de extração, foram observados valores próximos daqueles obtidos para os rendimentos de extração. Também com estes LIs foi possível obter melhores resultados no que diz respeito à extração/purificação de mAbs quando comparando com o sistema controlo em que nenhuma quantidade de LI foi adicionado.

Fazendo um balanço entre eficiências de extração, rendimentos e nível de pureza de IgG, constata-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando 10% de [C₄mpy]Cl. De modo a confirmar os resultados obtidos, na Figura 17 encontram-se representados os géis de eletroforese SDS-PAGE para as duas fases de SAB com este LI nas várias concentrações estudadas. Em todas as bandas se constata a presença tanto de anticorpo, como das restantes impurezas proteicas (em particular albumina, a cerca de 67 kDa) em ambas as fases. A albumina consiste na impureza proteica maioritária, e desta forma é a proteína com maior influência no grau de pureza de IgG obtido. De salientar que não se verificam diferenças de intensidade significativas nas bandas correspondentes ao anticorpo, o que se pode dever ao fato de existir uma elevada quantidade de albumina nas fases coexistentes.

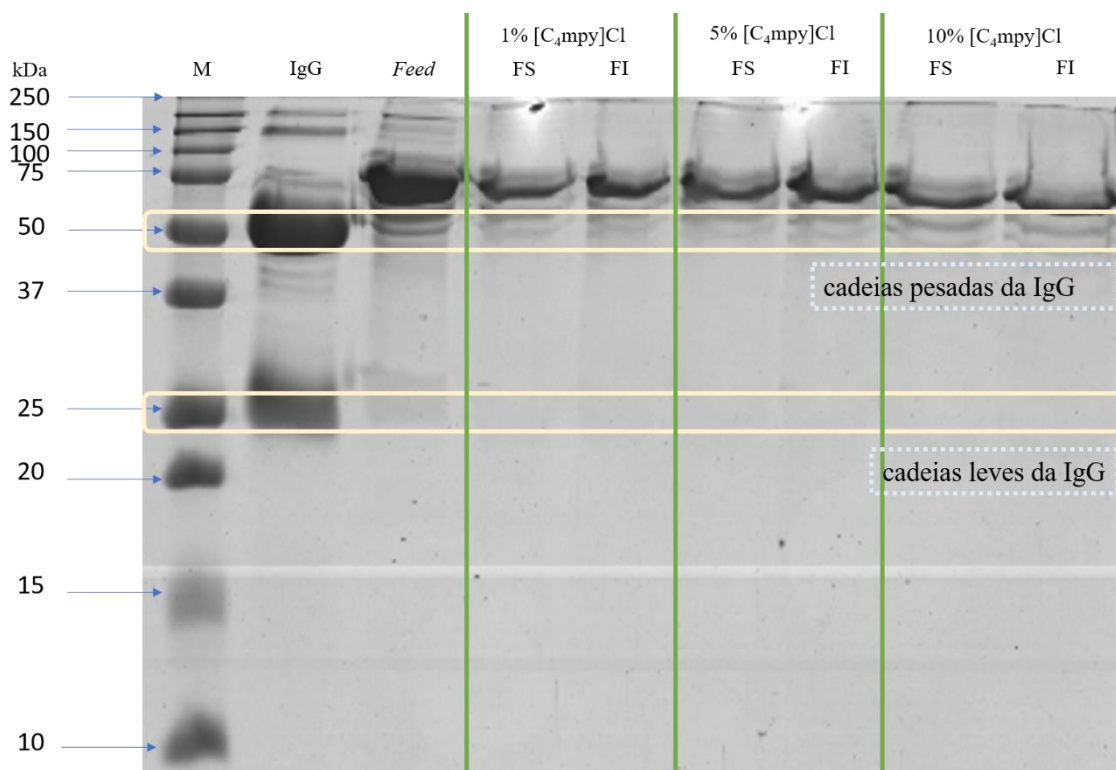


Figura 17 - SDS-PAGE de um gel, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de peso molecular; Poço 2 – IgG pura Gammanorm; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços – fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [C₄mpy]Cl). A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas no próprio gel.

De uma forma geral, e tendo em consideração os resultados obtidos, é possível constatar que em todas as condições estudadas envolvendo a utilização de LIs há um aumento do rendimento de extração da IgG para a fase superior rica em PEG comparativamente com o sistema original sem LI adicionado. O aumento do rendimento numa única etapa de extração apresenta-se como um resultado promissor tendo em vista o desenvolvimento de uma plataforma alternativa de extração de IgG de elevada eficiência a partir de sobrenadantes de culturas celulares. De salientar no entanto que o nível de pureza da IgG é ainda muito baixo, requeendo portanto ensaios futuros de modo a se alcançarem purezas de IgG possíveis de serem adoptadas pela indústria farmacêutica.

4. Conclusões e trabalho futuro

Com o objetivo de desenvolver novas plataformas de extração e purificação para anticorpos, e em particular para a IgG, neste trabalho foram testados SAB do tipo polímero-polímero integrando LIs como adjuvantes na sua constituição. Este tipo de sistemas foi primeiramente caracterizado através da determinação dos diagramas de fase respectivos, TLs e TLLs. Seguidamente, estes sistemas foram testados na extração e purificação de mAbs diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO. Os diferentes LIs estudados permitiram inferir acerca do efeito do catião, do anião e concentração do LI sobre a extração selectiva e rendimento de IgG para uma das fases de cada sistema. Foram alcançadas eficiências de extração superiores a 90% utilizando SAB constituídos por 10 (m/m)% de $[N_{4444}]\text{Cl}$, 1 (m/m)% de $[P_{444(14)}]\text{Cl}$, 10 (m/m)% de $[C_4\text{mim}]\text{Br}$ e 5 (m/m)% de $[C_4\text{mim}][\text{HSO}_4]$. Mais ainda, foi possível concluir que o LI $[C_4\text{mpy}]\text{Cl}$ quando adicionado como adjuvante a 10 (m/m)% permite aumentar a extração e purificação dos anticorpos monoclonais estudados. Embora os resultados obtidos no que diz respeito à pureza de IgG estejam longe do desejado para um processo que possa ser adotado pela indústria farmacêutica, é importante realçar que os LIs conduziram a uma melhor *performance* em termos de rendimentos e pureza quando comparados com o sistema controlo sem LI adicionado. Neste sentido, requerem-se ensaios adicionais, quer variando a composição do sistema e LI adicionado (por exemplo, 15, 20 e 25 (m/m)%), quer variando a quantidade de sobrenadante introduzido, de forma a que a purificação deste biofármaco possa ser alcançada numa única etapa. Também se poderão estudar outros pontos de mistura do sistema original PEG/dextrano, ou pontos de misturas ao longo da mesma TL que permitam alterar apenas a razão volumétrica das fases.

No futuro deverão ser explorados LIs mais benignos, biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis, tais como os derivados de aminoácidos (como a betaína e a glicina) e de hidratos de carbono.

5. Referências

1. Neil S. Lipman, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia T. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR journal*. 2005;46(3):258–268.
2. Moran LA. Principles of biochemistry. Pearson; 2012
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders; 2015. 8ed:535.
4. Biosciences A. Antibody purification handbook. Edition AC. 2002;10–18.
5. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*. 2005;20(1):17–29.
6. Owen JA, Punt J, Stranford SA. Kuby immunology. WH Freeman New York; 2013
7. McCullough KC, Summerfield A. Basic Concepts of Immune Response and Defense Development. *ILAR J*. 2005;46(3):230–240.
10. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(4):325–338.
15. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Demystified *Mol Pathol*. 2000;53(3):111–117.
10. Lehninger A, Nelson DL, Cox MM. Lehninger's Principles of Biochemistry. W H Freeman. 2005;
11. Elgert KD. Immunology: Understanding The Immune System. John Wiley & Sons; 2009. p. 740
13. Leenaars M, Hendriksen CFM. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR J*. 2005;46(3):269–279.
14. U S Food and Drug Administration. [citado 25 de Janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.fda.gov/>
15. Wang Y, Lomakin A, Latypov RF, Laubach JP, Hideshima T, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC, Benedek GB. Phase transitions in human IgG solutions. *J Chem Phys*. 2013;139(12).
16. Gelfand EW. Differences between IGIV products: Impact on clinical outcome. *International Immunopharmacology*. 2006;6(4):592–599.
17. WHO | Breast cancer: prevention and control. WHO.

18. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *PNAS*. 1992;89(10):4285–4289.
19. Phillips GDL, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RVJ, Lutz RJ, Wong WLT, Jacodson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res*. 2008;68(22):9280–9290.
20. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Olivia C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(26):2733–2743.
21. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14(3):737–744.
22. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del B, Bernado L, Brunt J, López-Bonet E, Menendez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: New insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *International Journal of Oncology*. 2010;37(3):669–678.
23. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, Ryan PD, Come SE, Burtein HJ, Lesnikoski BA, Kamma M, Friedman PN, Gelman R, Iglehart JD, Winer EP. Predictors of Resistance to Preoperative Trastuzumab and Vinorelbine for HER2-Positive Early Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1198–1207.
24. Rosa PAJ, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of Chromatography A*. 2007;1141(1):50–60.
25. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(1):28–39.
26. Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2296–2305.
27. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*. 2010;2(5):480–499.
28. Lecturer UGGVP member H. Frontmatter. John Wiley & Sons, Inc.; 2009; p. i–xxvi.

29. Marichal-Gallardo PA, Álvarez MM. State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: Process trends in design and validation. *Biotechnol Progress*. 2012;28(4):899–916.
30. Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*. 1981;20(9):2361–2370.
31. Li R, Dowd V, Stewart DJ, Burton SJ, Lowe CR. Design, synthesis, and application of a protein A mimetic. *Nature biotechnology*. 1998;16(2):190–195.
32. Eriksson K, Ljunglöf A, Rodrigo G, Brekkan E. MAb Contaminant removal with a multimodal anion exchanger. *BioProcess International*. 2009
33. Bolton G, Cormier J, Krishnan M, Lewnard J, Lutz H. Integrity testing of normal flow parvovirus filters using air-liquid based tests. *BIOPROCESSING JOURNAL*. 2006;5(1):50.
34. Strauss DM, Gorrell J, Plancarte M, Blank GS, Chen Q, Yang B. Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(1):168–175.
35. Connell-Crowley L, Nguyen T, Bach J, Chinniah S, Bashiri H, Gillespie R, Moscariello J, Hinckley P, Dehghani H, Vunnum S, Vedantham G. Cation exchange chromatography provides effective retrovirus clearance for antibody purification processes. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(1):157–165.
36. Jacobi A, Enenkel B, Garidel P, Eckermann C, Knappenberger M, Presser I, Kaufman H, Dübel S, Reichert JM. Process Development and Manufacturing of Therapeutic Antibodies. Dübel S, Reichert JM, editores. 2014;601–664.
37. Gottschalk U. Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. *Biotechnology progress*. 2008;24(3):496–503.
38. Follman DK, Fahrner RL. Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A. *Journal of Chromatography A*. 2004;1024(1–2):79–85.
39. Clausen AM, Subramanian A, Carr PW. Purification of monoclonal antibodies from cell culture supernatants using a modified zirconia based cation-exchange support. *Journal of Chromatography A*. 1999;831(1):63–72.
40. Hou Y, Brower M, Pollard D, Kanani D, Jacquemart R, Kachuik B, Stout J. Advective hydrogel membrane chromatography for monoclonal antibody purification in bioprocessing. *Biotechnol Progress*. 2015;31(4):974–982.
41. Ghosh R, Wang L. Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006;1107(1–2):104–109.

42. Giovannini R, Freitag R. Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography. *Biotechnol Bioeng*. 2001;73(6):522–529.
43. González Y, Ibarra N, Gómez H, González M, Dorta L, Padilla S, valdés R. Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: comparison with packed bed affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2003;784(1):183–187.
44. Lim S, Manus HP, Gooley AA, Williams KL, Rylatt DB. Purification of monoclonal antibodies from ascitic fluid using preparative electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1998;827(2):329–335.
45. Thomas TM, Shave EE, Bate IM, Gee SC, Franklin S, Rylatt DB. Preparative electrophoresis: a general method for the purification of polyclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*. 2002;944(1–2):161–168.
46. Castilho LR, Anspach FB, Deckwer W-D. Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *Journal of Membrane Science*. 2002;207(2):253–264.
47. Serpa G, Augusto EFP, Tamashiro WMSC, Ribeiro MB, Miranda EA, Bueno SMA. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*. 2005;816(1–2):259–268.
48. Taipa MÂ, Kaul R-H, Mattiasson B, Cabral JMS. Recovery of a monoclonal antibody from hybridoma culture supernatant by affinity precipitation with Eudragit S-100. *Bioseparation*. 2000;9(5):291–298.
49. Dainiak MB, Izumrudov VA, Muronetz VI, Galaev IY, Mattiasson B. Affinity precipitation of monoclonal antibodies by nonstoichiometric polyelectrolyte complexes. *Bioseparation*. 1998;7(4–5):231–240.
50. Handlogten MW, Stefanick JF, Deak PE, Bilgicer B. Affinity-based precipitation via a bivalent peptidic hapten for the purification of monoclonal antibodies. *Analyst*. 2014;139(17):4247–4255.
51. Holschuh K, Schwämmle A. Preparative purification of antibodies with protein A—an alternative to conventional chromatography. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005;293(1):345–348.
52. Borlido L, Moura L, Azevedo AM, Roque ACA, Aires-Barros MR, Farinha JPS. Stimuli-Responsive magnetic nanoparticles for monoclonal antibody purification. *Biotechnology Journal*. 2013;8(6):709–717.
53. Gagnon P, Toh P, Lee J. High productivity purification of immunoglobulin G monoclonal antibodies on starch-coated magnetic nanoparticles by steric exclusion of polyethylene glycol. *Journal of Chromatography A*. 2014;1324:171–180.
54. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Pisco AMMO, de Vries J, Korporaal R, Visser TJ, Aires-Barros MR. Affinity-enhanced purification of human antibodies by

- aqueous two-phase extraction. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):31–39.
55. Rosa PAJ, Azevedo AM, Sommerfeld S, Mutter M, Bäcker W, Aires-Barros MR. Continuous purification of antibodies from cell culture supernatant with aqueous two-phase systems: From concept to process. *Biotechnology Journal*. 2013;8(3):352–362.
 56. Roque ACA, Silva CSO, Taipa MÂ. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *Journal of Chromatography A*. 2007;1160(1–2):44–55.
 57. Raghavarao KSMS, Rastogi NK, Gowthaman MK, Karanth NG. Aqueous Two-Phase Extraction for Downstream Processing of Enzymes/Proteins. Em: Laskin SLN and AI, editor. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press; 1995;97–171.
 58. Beyerinck MW. Kulturversuche mit Amöben auf festem Substrate. *Centralb. f. Bakteriöl*. p 257-267.
 59. P.-Å A. Partition of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. Wiley New York. 1986;volume 346.
 60. Freire MG, Cláudio AFM, Araújo JMM, Coutinho JAP, Marrucho IM, Lopes JNC, Rebelo LPN. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Rev*. 2012;41(14):4966–4995.
 61. Hatti-Kaul R. *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media. Humana Press; 2000. p. 1–10.
 62. Bensch M, Selbach B, Hubbuch J. High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*. 2007;62(7):2011–2021.
 63. Andrews BA, Head DM, Dunthorne P, Asenjo JA. PEG activation and ligand binding for the affinity partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Biotechnol Tech*. 1990;4(1):49–54.
 64. Sulk B, Birkenmeier G, Kopperschlager G. Application of phase partitioning and thiophilic adsorption chromatography to the purification of monoclonal antibodies from cell culture fluid. *Journal of Immunological Methods*. 1992;149(2):165–171.
 65. Ba A, S N, Ja A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. *Bioseparation*. 1996;6(5):303–313.
 66. Rito-Palomares M, Dale C, Lyddiatt A. Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood. *Process Biochemistry*. 2000;35(7):665–673.
 67. Park H-M, Lee S-W, Chang W-J, Koo Y-M. Affinity separation by protein conjugated IgG in aqueous two-phase systems using horseradish peroxidase as a ligand carrier. *Journal of Chromatography B*. 2007;856(1–2):108–112.

68. Vargas M, Segura Á, Herrera M, Villalta M, Angulo Y, Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation. *Biotechnol Progress*. 2012;28(4):1005–1011.
69. Vargas M, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Gutiérrez JM, León G. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals*. 2015;43(1):37–46.
70. Wu Q, Lin D-Q, Yao S-J. Evaluation of poly(ethylene glycol)/hydroxypropyl starch aqueous two-phase system for immunoglobulin G extraction. *Journal of Chromatography B*. 2013;928:106–112.
71. Mündges J, Zierow J, Zeiner T. Experiment and simulation of an aqueous two-phase extraction process for the purification of a monoclonal antibody. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015;95:31–42.
72. Muendges J, Stark I, Mohammad S, Górak A, Zeiner T. Single stage aqueous two-phase extraction for monoclonal antibody purification from cell supernatant. *Fluid Phase Equilibria*. 2015;385:227–236.
73. Silva MFF, Fernandes-Platzgummer A, Aires-Barros MR, Azevedo AM. Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 2014;132:330–335.
74. Campos-Pinto I, Espitia-Saloma E, Rosa SASL, Rito-Palomares M, Aguilar O, Arévalo-Rodríguez M, Aires-Barros MR, Azevedo AM. Integration of cell harvest with affinity-enhanced purification of monoclonal antibodies using aqueous two-phase systems with a dual tag ligand. *Separation and Purification Technology*. 2017;173:129–134.
75. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of Biotechnology*. 2007;132(2):209–217.
76. Rosa PAJ, Azevedo AM, Sommerfeld S, Mutter M, Aires-Barros MR, Bäcker W. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: A multi-stage approach. *Journal of Biotechnology*. 2009;139(4):306–313.
77. Rosa PAJ, Azevedo AM, Sommerfeld S, Bäcker W, Aires-Barros MR. Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column. *Journal of Chromatography B*. 2012;880:148–156.
78. Silva DFC, Azevedo AM, Fernandes P, Chu V, Conde JP, Aires-Barros MR. Design of a microfluidic platform for monoclonal antibody extraction using an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography A*. 2012;1249:1–7.
79. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic interaction chromatography and size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1213(2):154–161.

80. Azevedo AM, Gomes AG, Rosa PAJ, Ferreira IF, Pisco AMMO, Aires-Barros MR. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):14–21.
81. Ferreira IF, Azevedo AM, Rosa PAJ, Aires-Barros MR. Purification of human immunoglobulin G by thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 2008;1195(1–2):94–100.
82. Rosa PAJ, Azevedo AM, Ferreira IF, de Vries J, Korporaal R, Verhoef HJ, Visser TJ, Aires-Barros MR. Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 2007;1162(1):103–113.
83. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, de Vries J, Visser TJ, Aires-Barros MR. Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(1–2):50–58.
84. Rosa PAJ, Azevedo AM, Ferreira IF, Sommerfeld S, Bäcker W, Aires-Barros MR. Downstream processing of antibodies: Single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(50):8741–8749.
85. Borlido L, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Extraction of Human IgG in Thermo-Responsive Aqueous Two-Phase Systems: Assessment of Structural Stability by Circular Dichroism. *Separation Science and Technology*. 2010;45(15):2171–2179.
86. Dhadge VL, Rosa SASL, Azevedo A, Aires-Barros R, Roque ACA. Magnetic aqueous two phase fishing: A hybrid process technology for antibody purification. *Journal of Chromatography A*. 2014;1339:59–64.
87. Ghosh K, Maiti M, Lahiri S. Separation of no-carrier-added ^{109}Cd from natural silver target using RTIL 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *J Radioanal Nucl Chem*. 2013;298(2):1049–1054.
88. Maiti M, Ghosh K, Lahiri S. Green methods for the radiochemical separations of no-carrier-added ^{61}Cu , ^{62}Zn from ^7Li irradiated cobalt target. *J Radioanal Nucl Chem*. 2015;303(3):2033–2040.
89. Dupont J, de Souza RF, Suarez PAZ. Ionic Liquid (Molten Salt) Phase Organometallic Catalysis. *Chem Rev*. 2002;102(10):3667–3692.
90. Canongia Lopes JNA, Pádua AAH. Nanostructural Organization in Ionic Liquids. *J Phys Chem B*. 2006;110(7):3330–3335.
91. Taha M, Almeida MR, Silva FAE, Domingues P, Ventura SPM, Coutinho JAP, Freire MG. Novel Biocompatible and Self-buffering Ionic Liquids for Biopharmaceutical Applications. *Chem Eur J*. 2015;21(12):4781–4788.
92. Freire MG, Neves CMSS, Marrucho IM, Lopes JNC, Rebelo LPN, Coutinho JAP. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chem*. 2010;12(10):1715–1718.

93. Ventura SPM, Barros RLF de, Barbosa JM de P, Soares CMF, Lima ÁS, Coutinho JAP. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chem.* 2012;14(3):734–740.
94. Pereira JFB, Lima ÁS, Freire MG, Coutinho JAP. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chem.* 2010;12(9):1661–1669.
95. Almeida MR, Passos H, Pereira MM, Lima ÁS, Coutinho JAP, Freire MG. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology.* 2014;128:1–10.
96. de Souza RL, Campos VC, Ventura SPM, Soares CMF, Coutinho JAP, Lima ÁS. Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes. *Fluid Phase Equilibria.* 2014;375:30–36.
97. Pei Y, Wang J, Wu K, Xuan X, Lu X. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Separation and Purification Technology.* 2009;64(3):288–295.
98. Hamzehzadeh S, Vasiresheh M. Ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide as a promoter for the formation and extraction capability of poly(ethylene glycol)-potassium citrate aqueous biphasic system at T=298.15K. *Fluid Phase Equilibria.* 2014;382:80–88.
99. Hamzehzadeh S, Abbasi M. The influence of 1-butyl-3-methyl-imidazolium bromide on the partitioning of l-tyrosine within the aqueous biphasic system at T=298.15K. *The Journal of Chemical Thermodynamics.* 2015;80:102–111.
100. Jain E, Kumar A. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnol Adv.* Fevereiro de 2008;26(1):46–72.
101. Merchuk JC, Andrews BA, Asenjo JA. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1998;711(1–2):285–293.
102. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72(1):248–254.

6. Anexos

Anexo A: Curva de calibração para a quantificação de IgG por cromatografia de afinidade com Proteína G.

Para cada ensaio de quantificação de IgG por cromatografia de afinidade utilizando a Proteína G, foi preparada uma curva de calibração utilizando IgG Gammanorm, em concentrações a variar entre os 0,2 mg/L e os 20 mg/L. Na Figura A.1 encontra-se representada um exemplo de uma curva de calibração tipicamente obtida para a quantificação de IgG. Esta representa a concentração de IgG, [IgG], expressa em mg/L em função da área do pico do cromatograma correspondente à IgG, expressa em mAU*min.

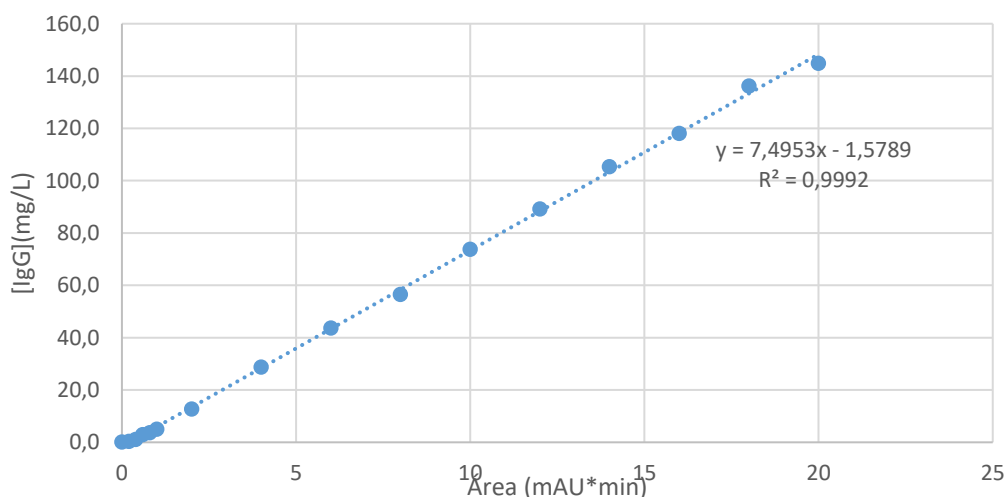


Figura A. 1 - Exemplo de uma curva de calibração utilizada para a quantificação de IgG por cromatografia de afinidade com Proteína G, obtida através de soluções stock de IgG Gammanorm com concentrações compreendidas entre 0,2 mg/L e 20 mg/L.

Anexo B: Curva de calibração para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford.

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford, utilizando uma curva de calibração preparada com BSA, em concentrações a variar entre os 5 mg/L e os 400 mg/L. A Figura B.1 apresenta um exemplo de uma curva de calibração tipicamente obtida para a quantificação das proteínas totais. Esta representa a concentração da BSA, [BSA], expressa em mg/L, em função da absorvância a um comprimento de onda de 595 nm.

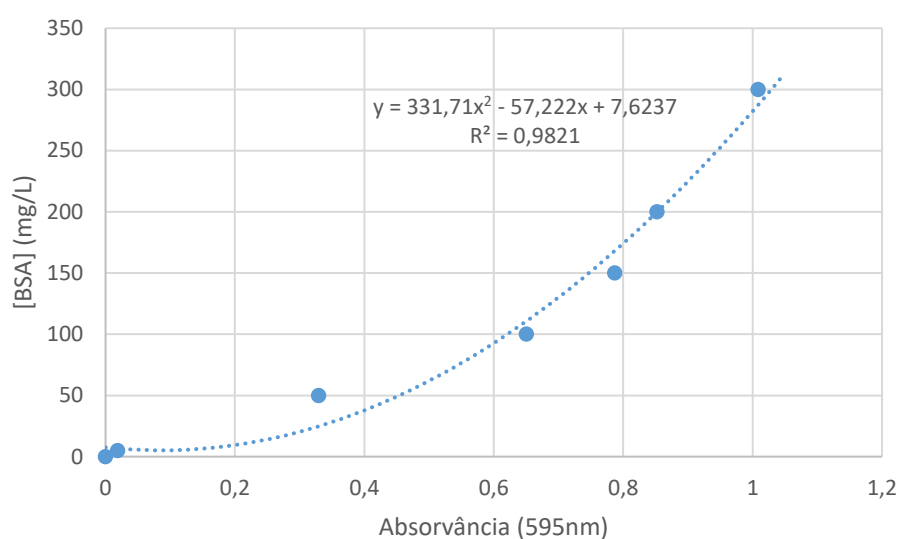


Figura B. 1 - Exemplo de uma curva de calibração utilizada para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, obtida com BSA em concentrações compreendidas entre 5 mg/L e 400 mg/L.

Anexo C: Curvas binodais experimentais

As frações mássicas do diagrama de fases do sistema composto por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O encontram-se listadas na Tabela C.1.

Tabela C. 1 – Frações mássicas correspondentes à curva binodal para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,1876	0,9523	90,8601
7,0894	3,1265	89,7841
7,0257	3,6671	89,3072
7,0051	3,7689	89,2260
6,9879	3,8752	89,1369
6,9453	3,9866	89,0681
6,9110	4,0988	88,9902
6,8654	4,2282	88,9064
6,8052	4,3512	88,8436
6,7262	4,4606	88,8132
6,6412	4,5759	88,7829
6,5871	4,7482	88,6647
6,5129	4,8893	88,5978
6,4302	5,0388	88,5310
6,3843	5,2418	88,3739
6,2979	5,6886	88,0135
6,2686	5,9499	87,7815
6,196	6,2027	87,6013
6,0772	6,4204	87,5024
5,9745	6,6618	87,3637
5,8023	7,3975	86,8002
5,6875	7,8608	86,4517
5,5683	8,2687	86,1630
5,4082	8,7601	85,8317
5,2548	9,2990	85,4462
5,1127	9,9729	84,9144
4,9377	10,8644	84,1979
4,7175	11,9233	83,3592
4,4241	12,9761	82,5998
3,8941	13,9323	82,1736
3,4322	15,2576	81,3102

As frações mássicas do diagrama de fases do sistema composto por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LIs como adjuvantes encontram-se listadas nas Tabelas C.2 a C.44.

Tabela C. 2 – Frações mássicas correspondentes à curva biondal para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [N₁₁₁₁]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0027	1,3184	90,6789
7,2400	3,1661	89,5939
7,2265	3,2675	89,5060
7,1771	3,3679	89,4550
7,1539	3,4791	89,3670
7,1034	3,5765	89,3201
7,0814	3,6827	89,2359
7,0250	3,7980	89,1770
6,9472	3,9192	89,1336
6,9151	4,1966	88,8883
6,8775	4,3862	88,7363
6,8129	4,5689	88,6182
6,7154	4,7408	88,5438
6,6487	4,9343	88,4170
6,5096	5,1287	88,3617
6,4916	5,3506	88,1578
6,3716	5,5880	88,0404
6,3690	5,8846	87,7464
6,2319	6,1518	87,6163
6,1423	6,4592	87,3985
6,0069	6,7925	87,2006
5,9188	7,1583	86,9229
5,7135	7,5034	86,7831
5,5059	8,0137	86,4804
5,3868	8,6795	85,9337
5,2955	9,4114	85,2931
5,1324	10,2041	84,6635
4,8724	11,1163	84,0113
4,4667	11,9033	83,6300
4,1401	13,2522	82,6077
3,6693	14,5542	81,7765

Tabela C. 3 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [N₁₁₁₁]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,5311	2,4032	90,0657
7,0018	3,6053	89,3929
6,9457	3,6733	89,3810
6,9208	3,7676	89,3116
6,9025	3,9772	89,1203
6,8638	4,0816	89,0546
6,8221	4,1956	88,9823
6,7927	4,3221	88,8852
6,7923	4,4743	88,7334
6,7281	4,6096	88,6623
6,6665	4,7403	88,5932
6,6422	4,8920	88,4658
6,6072	5,0467	88,3461
6,5153	5,2144	88,2703
6,4302	5,3816	88,1882
6,3951	5,5687	88,0362
6,3031	5,7514	87,9455
6,2272	5,9800	87,7928
6,1940	6,2161	87,5899
6,1118	6,5034	87,3848
6,0506	6,8193	87,1301
5,9832	7,1696	86,8472
5,7856	7,4538	86,7606
5,5722	7,7991	86,6287
5,4570	8,2084	86,3346
5,2900	8,6757	86,0343
5,1363	9,2336	85,6301
4,9329	9,9994	85,0677
4,7605	10,9745	84,2650
4,5345	12,0829	83,3826
4,3184	13,4752	82,2064
3,8288	15,0405	81,1307

Tabela C. 4 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [N₁₁₁₁]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,6856	3,0044	89,3100
7,1855	3,8884	88,9261
7,1534	3,9912	88,8554
7,0842	4,0976	88,8182
6,9885	4,1757	88,8358
6,9735	4,2875	88,7390
6,9704	4,7330	88,2966
6,8485	4,8865	88,2650
6,8197	5,0398	88,1405
6,7963	5,2459	87,9578
6,6729	5,4053	87,9218
6,6126	5,8584	87,5290
6,4093	6,2116	87,3791
6,3493	6,5072	87,1435
6,2437	6,7195	87,0368
6,1716	7,0006	86,8278
6,0948	7,3235	86,5817
5,9956	7,6487	86,3557
5,8417	7,9429	86,2154
5,7422	8,3731	85,8847
5,5818	8,8467	85,5715
5,3768	9,3635	85,2597
5,1506	9,9539	84,8955
4,9600	10,4985	84,5415
4,7375	11,1990	84,0635
4,5014	12,2870	83,2116
3,7597	13,4387	82,8016
3,4604	14,6338	81,9058

Tabela C. 5 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [N₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (\pm 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0027	1,3184	90,6789
7,2400	3,1653	89,5947
7,2265	3,2666	89,5069
7,1771	3,3669	89,4560
7,1539	3,4782	89,3679
7,1034	3,5756	89,3210
7,0814	3,6817	89,2369
7,0250	3,7969	89,1781
6,9472	3,9181	89,1347
6,9151	4,1955	88,8894
6,8775	4,3851	88,7374
6,8129	4,5677	88,6194
6,7154	4,7395	88,5451
6,6487	4,9330	88,4183
6,5096	5,1273	88,3631
6,4916	5,3492	88,1592
6,3716	5,5865	88,0419
6,3690	5,8830	87,7480
6,2319	6,1501	87,6180
6,1423	6,4574	87,4003
6,0069	6,7906	87,2025
5,9188	7,1563	86,9249
5,7135	7,5014	86,7851
5,5059	8,0116	86,4825
5,3868	8,6772	85,9360
5,2955	9,4089	85,2956
5,1324	10,2013	84,6663
4,8724	11,1134	84,0142
4,4667	11,9001	83,6332
4,1401	13,2487	82,6112
3,6693	14,5503	81,7804

Tabela C. 6 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [N₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,0750	2,3692	90,5558
6,7765	2,7844	90,4391
6,7574	2,9431	90,2995
6,7280	3,0354	90,2366
6,7166	3,1265	90,1569
6,6505	3,2213	90,1282
6,6455	3,4292	89,9253
6,6208	3,5636	89,8156
6,5787	3,7030	89,7183
6,5340	3,8503	89,6157
6,5104	4,0025	89,4871
6,4780	4,1791	89,3429
6,4254	4,3761	89,1985
6,3650	4,5631	89,0719
6,2764	4,7491	88,9745
6,2412	4,9717	88,7871
6,1190	5,1927	88,6883
6,1017	5,4770	88,4213
6,0229	5,7836	88,1935
5,9056	6,1303	87,9641
5,8275	6,5636	87,6089
5,7146	7,0546	87,2308
5,5074	7,5741	86,9185
5,2980	8,0438	86,6582
5,2260	8,9341	85,8399
4,9827	9,8225	85,1948
4,5864	10,5947	84,8189
4,3027	12,0104	83,6869

Tabela C. 7 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [N₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,2491	1,8966	89,8543
7,6870	2,1777	90,1353
6,9977	2,4341	90,5682
6,1754	3,2397	90,5849
6,1532	3,3521	90,4947
6,1204	3,4604	90,4192
6,0258	3,5629	90,4113
6,0103	3,6626	90,3271
5,9725	3,7757	90,2518
5,9510	3,8702	90,1788
5,8986	4,1312	89,9702
5,8858	4,4843	89,6299
5,7919	4,6590	89,5491
5,7583	4,8349	89,4068
5,7126	5,0259	89,2615
5,6801	5,5248	88,7951
5,5819	5,8724	88,5457
5,4764	6,2087	88,3149
5,2891	6,5263	88,1846
5,2519	6,8914	87,8567
5,1797	7,3076	87,5127
4,9950	7,7250	87,2800
4,8370	8,2195	86,9435
4,7390	8,7784	86,4826
4,6285	9,3827	85,9888
4,4479	10,1179	85,4342
4,2230	10,9037	84,8733
4,0447	11,8815	84,0738
3,5533	13,0475	83,3992
3,3171	15,0250	81,6579

Tabela C. 8 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [P₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (\pm 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,9409	2,2337	89,8254
7,2170	3,3171	89,4659
6,7771	3,6295	89,5934
6,7544	3,7212	89,5244
6,7151	3,8207	89,4642
6,7040	3,9349	89,3611
6,6812	4,0565	89,2623
6,6202	4,1757	89,2041
6,5697	4,2902	89,1401
6,5285	4,4140	89,0575
6,4831	4,5460	88,9709
6,4375	4,7094	88,8531
6,4017	5,0540	88,5443
6,3363	5,0766	88,5871
6,2388	5,2442	88,5170
6,1543	5,4375	88,4082
6,1090	5,6684	88,2226
6,0053	5,8932	88,1015
5,8970	6,1428	87,9602
5,7991	6,4028	87,7981
5,6639	6,6946	87,6415
5,5596	6,9903	87,4501
5,4843	7,3346	87,1811
5,3178	7,6998	86,9824
5,1831	8,0831	86,7338
5,0631	8,6200	86,3169
4,8483	9,1423	86,0094
4,6448	9,8808	85,4744
4,4499	10,6752	84,8749
4,2647	11,6892	84,0461
3,7876	12,7518	83,4606
3,3800	14,0044	82,6156

Tabela C. 9 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [P₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,8414	1,1020	91,0566
6,7831	2,2829	90,9340
6,6777	2,5285	90,7938
6,6561	2,6887	90,6552
6,6297	2,7658	90,6045
6,6123	2,8596	90,5281
6,6059	2,9611	90,4330
6,5290	3,0368	90,4342
6,5085	3,2114	90,2801
6,4736	3,3193	90,2071
6,3436	3,8202	89,8362
6,2500	3,9499	89,8001
6,2134	4,1354	89,6512
6,1715	4,3329	89,4956
6,0621	4,7080	89,2299
5,9563	4,9422	89,1015
5,8223	5,1493	89,0284
5,8024	5,4840	88,7136
5,6721	5,8314	88,4965
5,5273	6,1914	88,2813
5,5066	6,7217	87,7717
5,2558	7,2184	87,5258
5,0494	7,7624	87,1882
4,8452	8,4020	86,7528
4,6231	9,2757	86,1012
4,4061	10,4099	85,1840
4,2303	11,9630	83,8067
3,3724	14,4685	82,1591

Tabela C. 10 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [P₄₄₄₄]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0499	0,9223	91,0278
7,1221	1,3694	91,5085
6,6497	1,7780	91,5723
6,1781	2,7335	91,0884
6,1480	3,2292	90,6228
6,1412	3,3783	90,4805
6,1266	3,5142	90,3592
6,1044	3,6496	90,2460
6,0259	3,8723	90,1018
5,9776	3,9871	90,0353
5,9306	4,1263	89,9431
5,8286	4,6168	89,5546
5,7040	4,9263	89,3697
5,6576	5,4327	88,9097
5,5278	5,6917	88,7805
5,3662	5,8643	88,7695
5,3268	6,1214	88,5518
5,3109	6,3215	88,3676
5,1358	6,6341	88,2301
5,0117	6,9150	88,0733
4,9573	7,2676	87,7751
4,8203	7,6007	87,5790
4,7310	7,9882	87,2808
4,6943	8,6464	86,6593
4,5037	9,2266	86,2697
4,3062	9,7683	85,9255
4,0842	10,4730	85,4428
3,9605	11,5524	84,4871
3,6255	12,8494	83,5251
3,4449	14,5449	82,0102

Tabela C. 11 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0443	1,3493	90,6064
7,1417	2,6451	90,2132
6,8919	3,4763	89,6318
6,8734	3,5515	89,5751
6,8478	3,6285	89,5237
6,8036	3,6971	89,4993
6,7961	3,8805	89,3234
6,7391	3,9631	89,2978
6,7133	4,0616	89,2251
6,6729	4,1472	89,1799
6,649	4,259	89,0920
6,628	4,3727	88,9993
6,5726	4,482	88,9454
6,5078	4,5866	88,9056
6,4214	4,6924	88,8862
6,3992	4,8409	88,7599
6,3074	5,119	88,5736
6,2749	5,3156	88,4095
6,2163	5,4736	88,3101
6,1957	5,6947	88,1096
6,1036	5,8828	88,0136
6,04	6,0817	87,8783
5,9306	6,2951	87,7743
5,8606	6,5503	87,5891
5,7882	6,8298	87,3820
5,7069	7,1445	87,1486
5,6275	7,4579	86,9146
5,5166	7,7848	86,6986
5,3445	8,0456	86,6099
5,2092	8,4053	86,3855
5,1993	9,739	85,0617
4,9216	11,0153	84,0631
4,1711	12,9197	82,9092

Tabela C. 12 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,1310	0,8143	91,0547
6,3739	3,8287	89,7974
6,3563	3,9414	89,7023
6,3010	4,0410	89,6580
6,2419	4,1475	89,6106
6,2186	4,2771	89,5043
6,1773	4,3910	89,4317
6,1256	4,5111	89,3633
6,0331	4,9831	88,9838
5,9340	5,1129	88,9531
5,9230	5,3104	88,7666
5,8362	5,4995	88,6643
5,7677	5,6871	88,5452
5,6881	5,8910	88,4209
5,6012	6,0975	88,3013
5,5670	6,3385	88,0945
5,5023	6,6310	87,8667
5,4241	6,9379	87,6380
5,2572	7,1958	87,5470
5,1692	7,5318	87,2990
5,1103	7,9241	86,9656
4,9533	8,2708	86,7759
4,8427	8,7832	86,3741
4,7288	9,3741	85,8971
4,5297	9,8294	85,6409
4,3861	10,5678	85,0461
4,1690	11,3250	84,5060
3,9117	12,1815	83,9068
3,6895	13,3427	82,9678
3,2461	14,3999	82,3540

Tabela C. 13 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [P₄₄₄₍₁₄₎]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,7523	1,7856	90,4621
6,7594	2,0817	91,1589
6,2716	2,7306	90,9978
5,9513	3,0973	90,9514
5,9381	3,1864	90,8755
5,9135	3,3530	90,7335
5,8960	3,4540	90,6500
5,8812	3,5556	90,5632
5,8679	3,6612	90,4709
5,8073	3,7669	90,4258
5,7866	3,8953	90,3181
5,7566	4,0241	90,2193
5,7448	4,1696	90,0856
5,6483	4,2935	90,0582
5,5769	4,4233	89,9998
5,5286	4,5808	89,8906
5,5003	4,7678	89,7319
5,4616	4,9568	89,5816
5,3758	5,1404	89,4838
5,3014	5,3305	89,3681
5,2413	5,5793	89,1794
5,2036	5,8440	88,9524
5,0959	6,1261	88,7780
5,0091	6,4129	88,5780
4,9159	6,7356	88,3485
4,7764	7,0871	88,1365
4,6772	7,5438	87,7790
4,5537	8,0612	87,3851
4,0057	9,8790	86,1153
3,7956	10,7835	85,4209
3,4916	11,7544	84,7540
3,2148	13,0907	83,6945
2,8790	14,8458	82,2752

Tabela C. 14 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [C₄mim][HSO₄] como adjuvante a 25 °C (\pm 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,1822	1,2727	90,5451
7,4292	2,7918	89,7790
7,2659	3,1338	89,6003
7,2545	3,2170	89,5285
7,2436	3,3200	89,4364
7,1717	3,4040	89,4243
7,1353	3,5140	89,3507
7,1088	3,6122	89,2790
7,0919	3,7271	89,1810
7,0270	3,8557	89,1173
7,0242	4,0106	88,9652
6,9989	4,1534	88,8477
6,9649	4,3128	88,7223
6,8644	4,4700	88,6656
6,7802	4,6022	88,6176
6,6589	4,7434	88,5977
6,6221	5,1256	88,2523
6,5471	5,3606	88,0923
6,4689	5,6094	87,9217
6,3859	5,9160	87,6981
6,2661	6,1954	87,5385
6,2045	6,5624	87,2331
6,0784	6,9281	86,9935
5,9536	7,3391	86,7073
5,8480	7,8628	86,2892
5,7072	8,3771	85,9157
5,5339	9,0057	85,4604
5,3078	9,6479	85,0443
4,9910	10,2906	84,7184
4,6766	11,1582	84,1652
4,3701	12,3564	83,2735
3,9795	13,5760	82,4445
3,5983	15,1966	81,2051

Tabela C. 15 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [C₄mim][HSO₄] como adjuvante a 25 °C (\pm 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,4915	0,7349	90,7736
7,7769	1,6889	90,5342
7,3018	3,0336	89,6646
7,2993	3,1354	89,5653
7,2708	3,4825	89,2467
7,2062	3,6009	89,1929
7,1735	3,7255	89,1010
7,1470	3,8611	88,9919
7,0924	3,9781	88,9295
6,9713	4,1093	88,9194
6,9352	4,2461	88,8187
6,8790	4,5621	88,5589
6,7323	4,7515	88,5162
6,6004	4,9193	88,4803
6,5491	5,0967	88,3542
6,5347	5,2854	88,1799
6,3228	5,9382	87,7390
6,3097	6,2326	87,4577
6,1850	6,5701	87,2449
6,0624	6,9931	86,9445
6,0205	7,4530	86,5265
5,7677	7,8536	86,3787
5,4862	8,3205	86,1933
5,1700	8,8229	86,0071
4,9467	9,5560	85,4973
4,6425	10,3534	85,0041
4,4464	11,4168	84,1368
4,2343	12,6970	83,0687
3,7842	14,4325	81,7833

Tabela C. 16 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [C₄mim][HSO₄] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,4642	2,6577	89,8781
6,5087	3,7519	89,7394
6,4827	3,8620	89,6553
6,4784	3,9729	89,5487
6,4460	4,0647	89,4893
6,3107	4,1856	89,5037
6,2660	4,3066	89,4274
6,2652	4,4488	89,2860
6,1910	4,5653	89,2437
6,1887	4,7345	89,0768
6,1291	4,8570	89,0139
6,0497	4,9889	88,9614
5,9598	5,1601	88,8801
5,8166	5,2791	88,9043
5,7331	5,4374	88,8295
5,7314	5,7134	88,5552
5,6909	5,9793	88,3298
5,4676	6,2095	88,3229
5,3557	6,4799	88,1644
5,2388	6,8061	87,9551
5,1279	7,1525	87,7196
4,9737	7,5028	87,5235
4,7422	7,9478	87,3100
4,5638	8,3632	87,0730
4,3491	8,8327	86,8182
4,0884	9,4468	86,4648
3,8565	10,2425	85,9010
3,5617	10,8813	85,5570
3,2074	11,7556	85,0370
2,8956	12,9369	84,1675
2,4255	14,3808	83,1937

Tabela C. 17 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [C₄mim]Br como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,7304	1,9663	90,3033
6,8645	3,4260	89,7095
7,0417	3,1726	89,7857
6,9967	3,2538	89,7495
6,9460	3,3317	89,7223
6,9102	3,4195	89,6703
6,8801	3,5158	89,6041
6,8511	3,6155	89,5334
6,8342	3,7222	89,4436
6,8141	3,8453	89,3406
6,7945	3,9866	89,2189
6,7601	4,1121	89,1278
6,7203	4,2506	89,0291
6,6780	4,3988	88,9232
6,6287	4,5486	88,8227
6,5637	4,7191	88,7172
6,5162	4,9063	88,5775
6,4663	5,1043	88,4294
6,3923	5,2863	88,3214
6,2858	5,5053	88,2089
6,2183	5,7552	88,0265
6,1294	6,0247	87,8459
6,0504	6,3186	87,6310
5,9630	6,6315	87,4055
5,8156	7,0117	87,1727
5,6571	7,4031	86,9398
5,5315	7,8448	86,6237
5,3744	8,3357	86,2899
5,1899	8,9245	85,8856
4,2577	11,0214	84,7209
3,9236	12,2895	83,7869
3,5506	13,9163	82,5331

Tabela C. 18 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [C₄mim]Br como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,0781	2,5896	90,3323
7,0534	2,6557	90,2909
7,0166	2,7196	90,2638
6,9992	2,9597	90,0411
6,9651	3,0396	89,9953
6,9187	3,1137	89,9676
6,9176	3,4288	89,6536
6,8230	3,5277	89,6493
6,7734	3,6275	89,5991
6,7449	3,7446	89,5105
6,7113	3,8782	89,4105
6,6775	4,2307	89,0918
6,4550	4,3743	89,1707
6,6260	4,4241	88,9499
6,4857	4,5544	88,9599
6,4250	4,6743	88,9007
6,4015	4,8347	88,7638
6,3574	5,0307	88,6119
6,2419	5,2668	88,4913
6,1555	5,5271	88,3174
6,1190	5,8290	88,0520
5,9884	6,1322	87,8794
5,8859	6,4932	87,6209
5,8494	7,0300	87,1206
5,5969	7,5997	86,8034
5,4696	8,1148	86,4156
5,2697	8,7392	85,9911
4,6501	9,6936	85,6563
4,2645	11,1046	84,6309
3,8692	12,3708	83,7600
3,4887	14,9224	81,5889

Tabela C. 19 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [C₄mim]Br como adjuvante a 25 °C (\pm 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,5216	2,4568	90,0216
6,7378	2,8841	90,3781
6,7217	2,9807	90,2976
6,6989	3,1928	90,1083
6,6456	3,2999	90,0545
6,5947	3,4056	89,9997
6,5619	3,5088	89,9293
6,5706	3,6343	89,7951
6,5412	3,7712	89,6876
6,5113	3,9146	89,5741
6,4395	4,0747	89,4858
6,3781	4,2290	89,3929
6,3476	4,3903	89,2621
6,3055	4,5575	89,1370
6,2409	4,7729	88,9862
6,2124	5,0140	88,7736
6,1676	5,2567	88,5757
6,0155	5,4992	88,4853
5,9070	5,8607	88,2323
5,6866	6,0911	88,2223
5,6088	6,8618	87,5294
5,4809	7,3195	87,1996
5,2634	7,7790	86,9576
5,0595	8,5860	86,3545
4,8684	9,6137	85,5179
4,7069	10,6879	84,6052
4,0931	11,5345	84,3724
3,6006	12,8127	83,5867

Tabela C. 20 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [C₄mim]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,8470	1,5644	90,5886
7,1591	3,1329	89,7080
7,1047	3,2169	89,6784
7,0913	3,3055	89,6032
7,0746	3,4053	89,5201
7,0346	3,5076	89,4578
6,9952	3,7317	89,2731
6,9310	3,8398	89,2292
6,8590	3,9643	89,1767
6,8551	4,0875	89,0574
6,8089	4,2294	88,9617
6,7275	4,3858	88,8867
6,6347	4,5172	88,8481
6,5427	4,8837	88,5736
6,4324	5,0255	88,5421
6,4172	5,2960	88,2868
6,3697	5,5519	88,0784
6,1866	5,7616	88,0518
6,1687	6,0610	87,7703
6,0195	6,3782	87,6023
5,8063	6,6023	87,5914
5,7719	6,6820	87,5461
5,7417	7,0427	87,2156
5,6819	7,5139	86,8042
5,4768	7,8965	86,6267
5,3239	8,2800	86,3961
5,2353	8,9153	85,8494
5,0675	9,6798	85,2527
4,8476	10,5135	84,6389
4,4456	11,2601	84,2943
4,1284	12,5335	83,3381
3,4688	13,7729	82,7583

Tabela C. 21 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [C₄mim]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,0267	3,0214	89,9519
6,9756	3,0876	89,9368
6,9690	3,2713	89,7597
6,8906	3,4764	89,6330
6,8802	3,5794	89,5404
6,8573	3,7105	89,4322
6,8007	3,8324	89,3669
6,7616	3,9905	89,2479
6,6789	4,1113	89,2098
6,6541	4,2708	89,0751
6,6152	4,3802	89,0046
6,6001	4,4697	88,9302
6,5051	4,6484	88,8465
6,4175	4,8981	88,6844
6,2911	5,0897	88,6192
6,2262	5,3638	88,4100
6,1973	5,6455	88,1572
5,9672	5,8964	88,1364
5,8663	6,2677	87,8660
5,7125	6,6950	87,5925
5,5576	7,1506	87,2918
5,3567	7,6067	87,0366
5,0553	8,5722	86,3725
4,7042	9,1040	86,1918
3,0377	13,1545	83,8078
2,6011	14,7203	82,6786

Tabela C. 22 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [C₄mim]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,2237	1,4560	90,3203
7,0968	3,1664	89,7368
7,0607	3,2517	89,6876
7,0229	3,3365	89,6406
6,9942	3,4290	89,5768
6,9872	3,5302	89,4826
6,9469	3,6322	89,4209
6,9116	3,7377	89,3507
6,8743	3,8516	89,2741
6,8243	3,9792	89,1965
6,7775	4,1218	89,1007
6,6987	4,2564	89,0449
6,5802	4,5584	88,8614
6,5043	4,7342	88,7615
6,4570	5,1330	88,4100
6,4567	5,3969	88,1464
6,3780	5,6507	87,9713
6,2658	5,9093	87,8249
6,1469	6,2077	87,6454
6,0444	6,5301	87,4255
5,9191	6,8870	87,1939
5,7605	7,2882	86,9513
5,6755	7,4694	86,8551
5,5750	7,7440	86,6810
5,3599	8,2433	86,3968
5,1273	8,8074	86,0653
4,8044	9,4380	85,7576
4,5599	10,3600	85,0801
4,2858	11,4661	84,2481
3,9706	12,8483	83,1811
3,5421	14,6075	81,8504

Tabela C. 23 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [C₄mpy]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,8233	1,3378	90,8389
7,3512	2,1958	90,4530
7,1502	3,0660	89,7838
7,1085	3,1391	89,7524
7,0718	3,5122	89,4160
7,0419	3,6396	89,3185
6,9812	3,7419	89,2769
6,9508	3,8509	89,1983
6,9312	4,0049	89,0639
6,8624	4,1465	88,9911
6,8179	4,2802	88,9019
6,7186	4,5955	88,6859
6,6200	4,7542	88,6258
6,5756	4,9515	88,4729
6,4814	5,1602	88,3584
6,3792	5,3847	88,2361
6,3734	5,6564	87,9702
6,3528	5,9810	87,6662
6,2038	6,3451	87,4511
6,1032	6,7376	87,1592
6,0164	7,1820	86,8016
5,8106	7,6092	86,5802
5,6500	8,1624	86,1876
5,4813	8,7801	85,7386
5,2687	9,5257	85,2056
5,0643	10,3529	84,5828
4,7186	11,1157	84,1657
4,4541	12,5662	82,9797
4,0716	13,6564	82,2720
3,5018	15,1116	81,3866

Tabela C. 24 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [C₄mpy]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,6872	2,0969	90,2159
7,0005	3,1031	89,8964
6,9635	3,4034	89,6331
6,9327	3,8515	89,2158
6,9018	3,9709	89,1273
6,8713	4,3907	88,7380
6,8067	4,5567	88,6366
6,6636	4,7067	88,6297
6,6130	4,8510	88,5360
6,4531	5,0002	88,5467
6,4307	5,5090	88,0603
6,3151	5,8313	87,8536
6,0740	7,1324	86,7936
5,9111	7,6446	86,4443
5,5700	8,1296	86,3004
5,3473	8,7400	85,9127
5,0961	9,3990	85,5049
4,9311	10,1190	84,9499
4,7171	10,9932	84,2897
4,4422	11,9836	83,5742
3,9233	13,3257	82,7510
3,3945	14,8575	81,7480

Tabela C. 25 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [C₄mpy]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,7319	1,7715	90,4966
6,9489	3,3572	89,6939
6,9115	3,4518	89,6367
6,9188	3,5495	89,5317
6,8931	3,7637	89,3432
6,7996	3,8608	89,3396
6,7623	3,9652	89,2725
6,7332	4,0715	89,1953
6,6772	4,2169	89,1059
6,5062	4,3519	89,1419
6,4854	4,4747	89,0399
6,4756	4,6318	88,8926
6,4273	5,1927	88,3800
6,3319	5,4120	88,2561
6,1799	6,3121	87,5080
6,0753	6,5764	87,3483
5,8516	6,8510	87,2974
5,6899	7,1468	87,1633
5,5867	7,4598	86,9535
5,4930	7,8435	86,6635
5,3648	8,3339	86,3013
5,1974	8,9534	85,8492
5,0940	9,6301	85,2759
4,8914	10,4509	84,6577
4,6847	11,3394	83,9759
4,0168	12,6319	83,3513
3,6209	14,0989	82,2802

Tabela C. 26 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch][NTf₂] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,2819	2,1193	89,5988
7,7776	2,4754	89,7470
7,2682	2,9567	89,7751
6,8590	3,3772	89,7638
6,8172	4,4117	88,7711
6,7877	4,5456	88,6667
6,7347	4,6756	88,5897
6,7093	4,8139	88,4768
6,3092	5,2794	88,4114
6,2267	5,4468	88,3265
6,1698	5,6301	88,2001
6,0706	5,8255	88,1039
6,0015	6,0498	87,9487
5,9168	6,2804	87,8028
5,8226	6,5322	87,6452
5,7359	6,8094	87,4547
5,6279	7,1104	87,2617
5,5254	7,4467	87,0279
5,4028	7,8172	86,7800
5,2877	8,2712	86,4411
5,1159	8,7382	86,1459
5,0032	9,2949	85,7019
4,8599	9,9635	85,1766
4,6388	10,6670	84,6942
4,4819	11,6232	83,8949
4,0867	12,6274	83,2859
3,8377	14,0397	82,1226

Tabela C. 27 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch][NTf₂] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
6,1111	3,6614	90,2275
6,0665	3,7521	90,1814
6,0649	3,8602	90,0749
6,0462	3,9673	89,9865
5,9962	4,0745	89,9293
5,9575	4,1905	89,8520
5,9080	4,3073	89,7847
5,8950	4,4409	89,6641
5,8572	4,5868	89,5560
5,8091	4,7218	89,4691
5,7644	4,8859	89,3497
5,6996	5,0438	89,2566
5,6491	5,2268	89,1241
5,2433	6,1031	88,6536
5,0131	6,3683	88,6186
4,8321	6,6576	88,5103
4,6805	6,9744	88,3451
4,5578	7,3148	88,1274
4,4220	7,6991	87,8789
4,2881	8,0926	87,6193
4,1289	8,5906	87,2805
3,9654	9,1387	86,8959
3,8233	9,7972	86,3795
3,6397	10,5521	85,8082
3,3391	11,4926	85,1683
3,1697	12,5531	84,2772
2,8914	14,1004	83,0082

Tabela C. 28 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [Ch][NTf₂] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
5,0110	2,2838	92,7052
4,9625	2,3326	92,7049
4,9155	2,3823	92,7022
4,8719	2,4358	92,6923
4,8318	2,4974	92,6708
4,8062	2,5673	92,6265
4,7900	2,6532	92,5568
4,7716	2,7404	92,4880
4,7542	2,8268	92,4190
4,7230	2,9188	92,3582
4,6721	3,0287	92,2992
4,6716	3,1403	92,1881
4,6580	3,2557	92,0863
4,6158	3,3920	91,9922
4,5784	3,5289	91,8927
4,5575	3,6778	91,7647
4,5389	3,8583	91,6028
4,4504	4,0272	91,5224
4,3935	4,2299	91,3766
4,3402	4,4554	91,2044
4,2750	4,7090	91,0160
4,1868	4,9851	90,8281
4,0943	5,3057	90,6000
3,9767	5,6340	90,3893
3,8458	5,9886	90,1656
3,7643	6,4386	89,7971
3,6402	6,9683	89,3915
3,4465	7,5529	89,0006
3,3050	8,4328	88,2622
2,9613	9,3984	87,6403
2,6645	10,6186	86,7169
2,2590	12,2162	85,5248
1,9217	15,2947	82,7836

Tabela C. 29 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch][Bit] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,6933	2,0111	90,2956
7,1880	3,1762	89,6358
7,0805	3,4740	89,4455
7,0348	3,5686	89,3966
7,0251	3,8034	89,1715
7,0242	3,9309	89,0449
6,9987	4,0472	88,9541
6,9484	4,1665	88,8851
6,9001	4,3049	88,7950
6,8218	4,4539	88,7243
6,7580	4,6062	88,6358
6,6919	4,7617	88,5464
6,6347	4,9363	88,4290
6,5588	5,1213	88,3199
6,5033	5,3163	88,1804
6,4464	5,5283	88,0253
6,3419	5,7617	87,8964
6,2906	6,0253	87,6841
6,1666	6,2868	87,5466
6,0854	6,5821	87,3325
5,9891	6,9245	87,0864
5,8769	7,3035	86,8196
5,7503	7,7202	86,5295
5,6765	8,1938	86,1297
5,5317	8,6957	85,7726
5,3942	9,2967	85,3091
5,1359	9,9506	84,9135
4,9450	10,6802	84,3748
4,5514	11,4330	84,0156
4,1351	12,1933	83,6716
3,6432	13,1546	83,2022
3,2752	14,5708	82,1540

Tabela C. 30 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch][Bit] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,7300	2,5330	89,7370
7,2682	3,3774	89,3544
7,2339	3,4661	89,3000
7,2103	3,5605	89,2292
7,1994	3,6607	89,1399
7,1697	3,7645	89,0658
7,1142	3,8669	89,0189
7,0823	3,9808	88,9369
7,0541	4,1062	88,8397
7,0124	4,2365	88,7511
6,9821	4,3770	88,6409
6,9283	4,5280	88,5437
6,8675	4,6845	88,4480
6,8119	4,8498	88,3383
6,7384	5,0317	88,2299
6,6533	5,2045	88,1422
6,6110	5,4184	87,9706
6,5110	5,6325	87,8565
6,4340	5,8699	87,6961
6,3626	6,1436	87,4938
6,2364	6,4388	87,3248
6,1306	6,7301	87,1393
6,0396	7,0837	86,8767
5,8774	7,4620	86,6606
5,7230	7,8822	86,3948
5,5534	8,3739	86,0727
5,2519	8,7318	86,0163
5,0660	9,1592	85,7748
4,8619	9,9061	85,2320
4,6890	10,7817	84,5293
4,4349	11,8328	83,7323
4,1665	13,1276	82,7059
3,7326	14,5568	81,7106

Tabela C. 31 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [Ch][Bit] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,9208	2,5281	89,5511
7,4634	3,3867	89,1499
7,2340	3,7918	88,9742
7,2159	3,9097	88,8744
7,1395	4,0203	88,8402
7,0510	4,2723	88,6767
6,9465	4,3920	88,6615
6,9109	4,5105	88,5786
6,8843	4,6808	88,4349
6,7771	4,8539	88,3690
6,7253	5,0326	88,2421
6,5948	5,1930	88,2122
6,5273	5,3579	88,1148
6,4327	5,5331	88,0342
6,3870	5,7591	87,8539
6,2583	5,9990	87,7427
6,2113	6,2289	87,5598
6,0840	6,5198	87,3962
5,8516	7,3420	86,8064
5,7048	7,8941	86,4011
5,5553	8,3420	86,1027
5,3192	8,9182	85,7626
4,9907	9,5367	85,4726
4,9230	10,3389	84,7381
4,5885	11,1749	84,2366
4,3934	12,5978	83,0088
3,9116	14,3516	81,7368

Tabela C. 32 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch][DHP] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,3758	1,2269	90,3973
7,8042	1,8870	90,3088
7,1996	3,4981	89,3023
7,1786	3,6003	89,2211
7,1516	3,7065	89,1419
7,0662	3,8287	89,1051
7,0230	3,9355	89,0415
6,9765	4,0662	88,9573
6,8600	4,4772	88,6628
6,8021	4,6324	88,5655
6,7629	4,7883	88,4488
6,7267	4,9671	88,3062
6,5815	5,1594	88,2591
6,5273	5,3526	88,1201
6,5251	5,6509	87,8240
6,4219	5,9400	87,6381
6,2211	6,2434	87,5355
6,1414	6,5672	87,2914
6,0540	6,9142	87,0318
5,9167	7,3434	86,7399
5,7668	7,7210	86,5122
5,5678	8,1173	86,3149
4,9981	9,3760	85,6259
4,8137	10,2862	84,9001
4,6500	11,2383	84,1117
3,8922	14,0876	82,0202

Tabela C. 33 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch][DHP] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,9855	2,1057	89,9088
7,5059	3,6348	88,8593
7,4143	3,7017	88,8840
7,3701	3,7816	88,8483
7,3100	3,8928	88,7972
7,1202	4,0112	88,8686
7,0537	4,1228	88,8235
6,9756	4,2445	88,7799
6,9247	4,3742	88,7011
6,9039	4,5083	88,5878
6,8831	4,6538	88,4631
6,8635	4,8129	88,3236
6,8069	4,9860	88,2071
6,7254	5,1168	88,1578
6,5840	5,2374	88,1786
6,4903	5,4064	88,1033
6,4582	5,6276	87,9142
6,3959	5,8702	87,7339
6,2910	6,0666	87,6424
6,2383	6,4006	87,3611
6,0591	6,5226	87,4183
6,0017	6,8429	87,1554
5,9247	7,1978	86,8775
5,8268	7,5496	86,6236
5,2330	8,4910	86,2760
5,0751	8,9745	85,9504
4,9473	9,5448	85,5079
4,7384	10,1842	85,0774
3,7178	12,2568	84,0254
3,4367	13,6430	82,9203

Tabela C. 34 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [Ch][DHP] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,145	2,5448	89,3102
7,4314	3,7385	88,8301
6,815	4,5419	88,6431
6,7325	4,6426	88,6249
6,6513	4,7353	88,6134
6,5783	4,8413	88,5804
6,5384	4,9765	88,4851
6,5185	5,1235	88,3580
6,5031	5,273	88,2239
6,478	5,454	88,0680
6,4236	5,6229	87,9535
6,3068	5,776	87,9172
6,2389	5,9193	87,8418
6,1466	6,0771	87,7763
6,0661	6,2753	87,6586
5,9971	6,4976	87,5053
5,9672	6,748	87,2848
5,8267	6,9611	87,2122
5,7191	7,1679	87,1130
5,5838	7,4414	86,9748
5,4347	7,6955	86,8698
5,2924	7,9979	86,7097
5,2035	8,3629	86,4336
5,0959	8,7635	86,1406
4,9496	9,1685	85,8819
4,8396	9,6978	85,4626
4,5594	10,1245	85,3161
4,295	10,6953	85,0097
4,0667	11,4244	84,5089
3,8744	12,2575	83,8681
3,6652	13,3506	82,9842
3,2686	14,4666	82,2648

Tabela C. 35 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,1682	3,4127	89,4191
7,1655	3,5137	89,3208
7,1387	3,6335	89,2278
7,1098	3,7505	89,1397
7,0643	3,8641	89,0716
7,0297	3,9892	88,9811
6,9393	4,1140	88,9467
6,9017	4,2455	88,8528
6,8210	4,5364	88,6426
6,6617	5,0098	88,3285
6,5736	5,2286	88,1978
6,4616	5,4540	88,0844
6,3662	5,6715	87,9623
6,2673	5,9042	87,8285
6,2215	6,1767	87,6018
6,1695	6,5143	87,3162
6,0292	6,8787	87,0921
5,8681	7,2660	86,8659
5,7832	7,7322	86,4846
5,6183	8,1580	86,2237
5,4309	8,6912	85,8779
5,2346	9,3616	85,4038
5,0862	10,0587	84,8551
4,9360	11,0333	84,0307
4,7134	12,2109	83,0757
4,2490	13,6287	82,1223
3,7301	14,9444	81,3255

Tabela C. 36 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,9131	1,9572	90,1297
7,5134	2,9269	89,5597
7,4678	3,0071	89,5251
7,4474	3,1018	89,4508
7,3739	3,3891	89,2370
7,3693	3,5127	89,1180
7,3008	3,6328	89,0664
7,2455	3,7446	89,0099
7,1883	4,0343	88,7774
7,0836	4,1966	88,7198
6,9731	4,3470	88,6799
6,8832	4,5415	88,5753
6,8116	4,6985	88,4899
6,6513	5,1339	88,2148
6,5412	5,3650	88,0938
6,3888	5,5801	88,0311
5,9906	7,3793	86,6301
5,8180	7,9007	86,2813
5,5979	8,4611	85,9410
5,4117	8,2673	86,3210
5,4951	9,0725	85,4324
5,3297	9,8034	84,8669
5,1299	10,6848	84,1853
4,8021	11,6519	83,5460
4,3515	12,8141	82,8344
3,6730	14,0247	82,3023

Tabela C. 37 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [Ch]Cl como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,2253	1,7869	89,9878
7,3310	3,2195	89,4495
7,1865	3,8817	88,9318
7,1184	3,9866	88,8950
7,0882	4,0943	88,8175
7,0337	4,2126	88,7537
7,0073	4,3367	88,6560
6,8694	4,4245	88,7061
6,8400	4,5494	88,6106
6,7123	4,6880	88,5997
6,6910	4,8413	88,4677
6,6044	5,0067	88,3889
6,5794	5,1840	88,2366
6,5605	5,3738	88,0657
6,5133	5,5596	87,9271
6,4853	5,7672	87,7475
6,3888	5,9918	87,6194
6,3046	6,2256	87,4698
6,2060	6,4791	87,3149
6,0862	6,7607	87,1531
5,9387	7,0535	87,0078
5,8020	7,3598	86,8382
5,6387	7,6896	86,6717
5,5445	8,0722	86,3833
5,3649	8,5103	86,1248
5,2195	9,1048	85,6757
5,0531	9,3583	85,5886
4,4843	10,6589	84,8568
4,3157	11,5474	84,1369
4,0684	12,7447	83,1869
3,7077	14,0070	82,2853
3,3398	15,4420	81,2182

Tabela C. 38 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch][Ac] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,9847	3,7975	88,2178
7,8468	4,1788	87,9744
7,7629	4,2848	87,9523
7,5414	4,3611	88,0975
7,0562	4,6618	88,2820
7,0020	4,8509	88,1471
6,8522	5,0165	88,1313
6,6714	5,2814	88,0472
6,5229	5,5512	87,9259
6,4848	5,7824	87,7328
6,3780	6,0337	87,5883
6,2390	6,3019	87,4591
6,1521	6,6127	87,2352
5,9855	6,9357	87,0788
5,9358	7,3510	86,7132
5,7845	7,7758	86,4397
5,6823	8,2294	86,0883
5,6061	8,8723	85,5216
5,3927	9,5397	85,0676
5,1624	10,2492	84,5884
4,9201	11,1119	83,9680
3,7274	14,7158	81,5568

Tabela C. 39 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch][Ac] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0963	1,7494	90,1543
7,2840	3,7546	88,9614
7,2722	3,8478	88,8800
7,2416	3,9342	88,8242
7,1977	4,0437	88,7586
7,1377	4,1437	88,7186
7,0952	4,2437	88,6611
7,0773	4,3592	88,5635
7,0841	4,5020	88,4139
7,0145	4,6377	88,3478
6,8860	4,6965	88,4175
6,8171	4,7626	88,4203
6,8220	4,9281	88,2499
6,7693	5,3259	87,9048
6,7336	5,5551	87,7113
6,6604	5,7755	87,5641
6,5690	5,9908	87,4402
6,4871	6,2175	87,2954
6,3476	6,4475	87,2049
6,2168	6,6810	87,1022
6,1726	6,9911	86,8363
6,1390	7,3243	86,5367
6,0269	7,6902	86,2829
5,8910	8,0824	86,0266
5,8050	8,5484	85,6466
5,6390	9,0389	85,3221
5,5001	9,6002	84,8997
4,8715	11,8296	83,2989
4,5161	12,7550	82,7289
4,1575	14,1098	81,7327

Tabela C. 40 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 7,5% de [Ch][Ac] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,4014	2,6310	88,9676
7,6612	3,4306	88,9082
7,1820	4,2905	88,5275
7,1547	4,4045	88,4408
7,1169	4,5295	88,3536
7,1023	4,8139	88,0838
7,0397	4,9444	88,0159
6,9535	5,0527	87,9938
6,8688	5,1866	87,9446
6,7797	5,3231	87,8972
6,6965	5,4697	87,8338
6,6110	5,6244	87,7646
6,5734	5,8439	87,5827
6,5183	6,0600	87,4217
6,4685	6,2665	87,2650
6,3688	6,5048	87,1264
6,3267	6,7815	86,8918
6,2470	7,0547	86,6983
6,1540	7,3532	86,4928
6,0371	7,6449	86,3180
5,8595	7,9092	86,2313
5,6877	8,2174	86,0949
5,5181	8,5368	85,9451
5,3473	8,9763	85,6764
5,1488	9,4590	85,3922
4,9404	9,9662	85,0934
4,7306	10,7858	84,4836
4,6133	11,7735	83,6132
4,3664	12,7510	82,8826
4,0687	13,7940	82,1373
3,7345	15,1417	81,1238

Tabela C. 41 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 10% de [Ch][Ac] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,2157	2,6415	89,1428
7,4808	4,0433	88,4759
7,4185	4,1291	88,4524
7,4034	4,2567	88,3399
7,3783	4,3681	88,2536
7,3551	4,4895	88,1554
7,3274	4,6151	88,0575
7,2736	4,7225	88,0039
7,2181	4,8669	87,9150
7,1823	5,0132	87,8045
7,1408	5,1680	87,6912
7,0659	5,3323	87,6018
6,9240	5,4437	87,6323
6,9420	5,6924	87,3656
6,7826	5,9091	87,3083
6,7978	6,1575	87,0447
6,6921	6,3926	86,9153
6,6061	6,5310	86,8629
6,5967	6,6044	86,7989
6,4908	6,9164	86,5928
6,4210	7,2296	86,3494
6,2496	7,5836	86,1668
6,1303	7,9375	85,9322
6,0069	8,3339	85,6592
5,7336	8,8373	85,4291
5,6069	9,2429	85,1502
5,4101	9,8425	84,7474
5,2496	10,4741	84,2763
4,9848	11,3456	83,6696
4,7440	12,2180	83,0380
4,4630	13,4690	82,0680
4,0454	14,9969	80,9577

Tabela C. 42 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 15% de [Ch][Ac] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
7,7524	4,7314	87,5162
7,7164	4,8392	87,4444
7,6654	4,9495	87,3851
7,6317	5,0710	87,2973
7,6039	5,1933	87,2028
7,5374	5,3275	87,1351
7,4868	5,4546	87,0586
7,3847	5,5959	87,0194
7,3695	5,7434	86,8871
7,3367	5,8779	86,7854
7,2888	6,0287	86,6825
7,2286	6,1813	86,5901
7,1829	6,3682	86,4489
6,9206	6,6115	86,4679
6,8559	6,7998	86,3443
6,8411	7,0715	86,0874
6,8034	7,3570	85,8396
6,7048	7,6048	85,6904
6,3601	7,9475	85,6924
6,2627	8,2182	85,5191
6,1635	8,5441	85,2924
6,0501	8,8920	85,0579
5,9385	9,2689	84,7926
5,8138	9,6530	84,5332
5,6842	10,0855	84,2303
5,5615	10,7204	83,7181
5,3598	11,3905	83,2497
5,1336	12,1538	82,7126
4,8008	12,8286	82,3706
4,4625	13,5787	81,9588
4,1908	14,4825	81,3267

Tabela C. 43 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 1% de [Ch][But] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0462	1,4493	90,5045
7,4119	2,4675	90,1206
7,5065	3,2882	89,2053
7,4846	3,3599	89,1555
7,4755	3,4325	89,0920
7,4236	3,5257	89,0507
7,4066	4,0012	88,5922
7,3775	4,2733	88,3492
7,3388	4,4030	88,2582
7,2935	4,5626	88,1439
7,2223	4,7107	88,0670
7,1395	4,8597	88,0008
7,0930	5,0156	87,8914
7,0541	5,3823	87,5636
7,0203	5,6124	87,3673
6,5220	6,5009	86,9771
6,3136	6,8142	86,8722
6,1986	7,1089	86,6925
5,9021	7,4649	86,6330
5,6186	7,8718	86,5096
5,4163	8,3115	86,2722
5,2496	8,8311	85,9193
5,0093	9,3792	85,6115
4,8739	10,1073	85,0188
4,4846	11,0110	84,5044
4,2670	11,9381	83,7949
3,8513	13,1521	82,9966
3,5540	14,7115	81,7345

Tabela C. 44 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) + 5% de [Ch][But] como adjuvante a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
8,0510	1,7167	90,2323
7,6570	2,5465	89,7965
7,6193	2,6103	89,7704
7,5835	2,9238	89,4927
7,5583	3,1256	89,3161
7,5241	3,2235	89,2524
7,4981	3,3512	89,1507
7,4577	3,4758	89,0665
7,3848	3,7730	88,8422
7,3037	3,9171	88,7792
7,2201	4,0765	88,7034
7,1839	4,2637	88,5524
7,0859	4,4437	88,4704
6,9943	4,6663	88,3394
6,9828	4,9481	88,0691
6,9352	5,2440	87,8208
6,8317	5,5347	87,6336
6,6252	5,8382	87,5366
6,5738	6,2386	87,1876
6,4062	6,6501	86,9437
6,1286	8,0351	85,8363
5,8286	8,6541	85,5173
5,5971	9,4951	84,9078
5,3071	10,6026	84,0903
5,0615	11,9210	83,0175
4,5138	13,6724	81,8138